

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biochemie

Studijní obor: Biochemie



LUCIE VAŠKOVÁ

**Studium vlivu IgY na interakce bakterií a plicních buněk
v podmínkách *ex vivo***

The effect of IgY on bacterial adhesion on epithelial cells *ex vivo*

Diplomová práce

Vedoucí práce: prof. RNDr. Petr Hodek, CSc.

Praha, 2016

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze

Podpis

Poděkování

Na tomto místě bych ráda poděkovala prof. RNDr. Petru Hodkovi, CSc. za odborné vedení této diplomové práce, cenné rady a připomínky při jejím zpracování. Dále bych ráda poděkovala kolektivu katedry biochemie, zejména Bc. Kateřině Peckové, za spolupráci a pomoc během experimentální činnosti.

Děkuji své rodině za poskytnuté zázemí a podporu.

Abstrakt

Cystická fibrosa je autozomálně recesivní onemocnění způsobené mutací v genu CFTR kódujícím chloridový kanál na apikální membráně epitelálních buněk. To vede ke změně transportu iontů a zahuštění hlenů v dýchacích cestách, kde navíc dochází ke změnám glykosylace povrchových struktur, které se stávají vhodným cílem pro adhezi bakterií. Chronické bakteriální infekce vedou k postupnému snižování funkce plic, poškození plicní tkáně a jsou hlavní příčinou úmrtí pacientů s CF.

Pseudomonas aeruginosa je nejčastější patogen způsobující chronické infekce u pacientů s CF. Tyto bakterie vytvářejí biofilm, který je chrání před účinky imunitního systému a antibiotik. Jakmile dojde ke kolonizaci PA, je obtížné se tohoto patogenu zbavit. Prevencí chronických infekcí PA by mohla být profylaktická léčba orálně podávanými slepičími protilátkami proti adhezivním strukturám PA.

V této práci byla testována protilátka proti bakteriálnímu lektinu PA-IIL, který je jedním z klíčových struktur podílejících se na adhezi tohoto patogenu na epitelální buňky. Nejprve bylo ověřeno, že použitá specifická protilátka z vaječných žloutků slepice imunizované bakteriálním lektinem PA-IIL rozeznává specificky tento lektin, a to jak rekombinantně připravený, tak přirozeně exprimovaný bakteriemi *Pseudomonas aeruginosa*. Vliv těchto protilátek na adherenci PA byl studován na epitelálních buňkách pacienta s CF (CuFi-1) a zdravého jedince (NuLi-1). Vyhodnocení vlivu protilátek na adhezi bakterií bylo provedeno spektrofotometricky, kdy byl určován poměr fluorescencí bakteriálních a epitelálních buněk značených fluorochromy PKH.

Použitím luminiscenčního kmenu PA bylo prokázáno, že fluorescenční barvení nemá vliv na viabilitu bakteriálních buněk a jejich schopnost adheze.

Reprodukovatelně bylo zjištěno, že specifická slepičí protilátka proti lektinu PA-IIL efektivně snižuje schopnost adheze bakteriálních buněk na buňky plicního epitelu až o 67 % u obou linií plicních buněk oproti buňkám bez přidané protilátky. Tento trend byl pozorován u všech použitých bakteriálních kmenů a byla prokázána koncentrační závislost na množství použité protilátky.

Kontrolní protilátka naopak vazbu bakterií na plicní buňky zvyšuje. To může být způsobeno interakcí bakteriálních lektinů se sacharidy protilátky. Díky dimerické struktuře protilátky může dojít k prosítění bakteriálních buněk přes protilátky, což znesnadní odstranění bakterií v průběhu promývání.

Dále byl studován vliv rekombinantně připraveného lektinu PA-IIL na bakteriální adhezi. Preinkubace plicních buněk s lektinem PA-IIL však vazbu bakterií neovlivnila.

Výrazné snížení množství navázaných bakterií v přítomnosti specifické protilátky proti lektinu PA-IIL naznačuje, že slepičí protilátky by mohly být vhodným prostředkem v prevenci bakteriálních infekcí patogenem *Pseudomonas aeruginosa* u pacientů s CF.

Klíčová slova: buněčné linie, žlutkové protilátky, luminiscence bakterií, fluorescenční značení

Abstract

Cystic fibrosis is an autosomal recessive disease caused by mutation in CFTR gene coding for a chloride channel in apical membrane of epithelial cells. This disorder leads to the change in ion transport causing the increase in mucus viscosity in airways as well as changes in glycosylation of saccharide structures on the cells. Because of that these cells are the target for bacterial adhesion. Chronic bacterial infections, which lead to gradual decline of lung function and damage of lung tissue, are the major cause of death of patients suffering with cystic fibrosis.

Pseudomonas aeruginosa is the main pathogen causing chronic infections in cystic fibrosis patients. This bacterium produces a biofilm protecting them from host immune system and antibiotics. Once the colonization with PA occurs, it is difficult to get rid of this pathogen. The prophylactic treatment with orally administered hen antibodies against the PA virulence structures could be a prevention of chronic PA infections.

In this work we tested the antibody against the bacterial lectin PA-IIL, which is suggested to be involved in the adhesion of the pathogen on epithelial cells. First, it was verified that the prepared antibody from egg yolks of a hen immunized with the bacterial lectin PA-IIL recognizes this antigen expressed recombinantly as well as naturally by *Pseudomonas aeruginosa*.

The influence of this antibody on the adherence of PA was studied on epithelial cells derived from a CF patient (CuFi-1) and a healthy individual (NuLi-1). The effect of antibodies on the PA adhesion was determined by means of spectrofluorimetry as ratio of fluorescence of bacterial and epithelial cells stained with fluorochromes PKH.

By using a luminescent strain of PA we demonstrated that fluorescent dying does not affect the viability of the bacterial cells and their adherence.

Reproducibly we found that the specific chicken anti-PA-IIL antibody effectively reduces adhesion of bacterial cells to lung epithelial cells up to 67% in both lung cell lines compared to PBS treated controls. This trend, which is concentration dependent, was observed for all bacterial strains used.

On the other hand, control antibody increases the binding of bacteria on lung cells. This may be caused by an interaction between bacterial lectins and antibody saccharides. Because of the dimeric structure of the antibody, the inter-linking of bacterial cells via the antibody can occur. The removal of resulting bacterial aggregates is limited during the lung cells washing.

Furthermore, we studied the influence of the recombinantly prepared PA-IIL lectin on the bacterial adhesion. Pre-incubation of lung cells with lectin PA-IIL did not affect the binding of the bacterial cells.

The significant reduction in amounts of bound bacteria in the presence of specific antibodies anti-PA-IIL suggests that hen antibodies would be a suitable tool of preventing bacterial infections caused by *Pseudomonas aeruginosa* in patients with cystic fibrosis.

Key words: cell line, yolk antibody, luminescence of bacteria, fluorescence labelling

Obsah

Seznam zkratek.....	1
1 ÚVOD	2
1.1 Cystická fibrosa	2
1.1.1 Charakteristika onemocnění	2
1.1.2 CFTR protein.....	3
1.1.3 Klinické příznaky	5
1.1.4 Diagnostika onemocnění	6
1.1.5 Léčba.....	7
1.1.6 Imunita u pacientů s CF	10
1.1.7 Slepíčí protilátky	13
1.1.8 Změny glykosylace u CF	15
1.2 Bakterie napadající pacienty s CF.....	16
1.2.1 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	16
2 Cíl práce	21
3 Materiál a metody.....	22
3.1 Použitý materiál a přístroje	22
3.1.1 Přístroje	22
3.1.2 Materiál.....	23
3.2 Práce s tkáňovými kulturami	25
3.2.1 Zamražení buněčných linií.....	25
3.2.2 Rozmražení buněčných linií	25
3.2.3 Kultivace buněčných linií.....	26
3.2.4 Subkultivace linií.....	27
3.2.5 Určení viability a množství buněk pomocí barvení trypanovou modří.....	27

3.2.6	Potažení kultivačních nádob kolagenem	28
3.3	Práce s bakteriálními kmeny <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	29
3.3.1	Zamražení bakteriálních linií	30
3.4	Fluorescenční značení buněk	30
3.4.1	Fluorescenční značení bakteriálních buněk pomocí PKH26	30
3.4.2	Fluorescenční značení plicních buněk pomocí PKH67	31
3.5	Adhezní test	32
3.6	ELISA	33
3.7	Elektroforesa a „Western blot“	35
3.7.1	Příprava vzorků	35
3.7.2	SDS elektroforesa v polyakrylamidovém gelu	35
3.7.3	„Western blot“	37
4	Výsledky	39
4.1	ELISA	39
4.2	Elektroforesa a „Western blot“ lektinu PAIIL	41
4.3	Adhezní testy	42
4.3.1	Optimalizace množství protilátky	43
4.3.2	Porovnání adherence bakterií pěstovaných v rozdílných médiích	46
4.3.3	Hodnocení vlivu fluorescenčního barvení na adherenci bakterií	47
4.3.4	Porovnání adheze různých bakteriálních kmenů PA	51
4.3.5	Porovnání účinku kontrolních protilátek	58
4.3.6	Vliv volného lektinu PA-IIL na adherenci bakteriálních buněk	59
5	Diskuze	61
6	Souhrn	67
7	Seznam použité literatury	68

Seznam zkratek

ABC	„ATP-binding cassette“
ATP	adenosintrifosfát
BCIP	5-bromo-4-chloro-3-indolyl fosfát
BIS	N,N-methylen-bis-akrylamid
BSA	hovězí sérový albumin
cAMP	cyklický adenosinmonofosfát
CF	cystická fibrosa
CFTR	„cystic fibrosis transmembrane conductance regulator“
DNA	deoxyribonukleová kyselina
DMSO	dimethylsulfoxid
ELISA	„Enzyme Linked Immunosorbent Assay“
EDTA	ethylendiamintetraoctová kyselina
FBS	fetální telecí sérum
Ig	imunoglobulin
KA	afinitní konstanta
kb	kilobáze
kDa	kilodalton, jednotka molekulové hmotnosti
M	mol/dm ³ , jednotka koncentrace
Mr	molekulová hmotnost
MSD	„membrane spanning domain“
M9	minimální růstové médium pro bakteriální buňky
NBD	„nucleotide binding domain“
NBT	p-nitrotetrazolium blue
PA	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
PA-IL, PA-IIL	lektiny <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
PBS	„phosphate buffered saline“
PK	proteinkinasa
PS	plné růstové médium pro bakteriální buňky
PVDF	polyvinylidendifluorid
RPM	počet otáček za minutu
SDS	dodecylsulfát sodný
TEMED	N,N,N',N'-tetramethylethylendiamin
Tris	2-amino-2-hydroxymethylpropan-1,3-diol
UV	ultrafialové záření

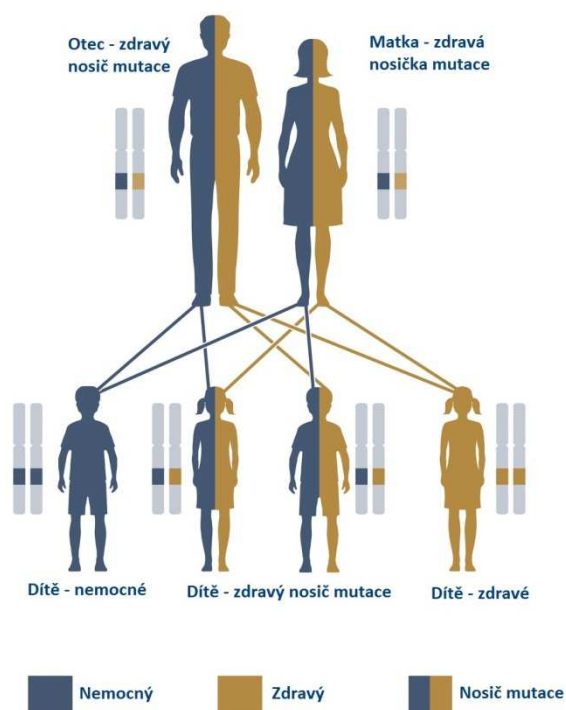
1 ÚVOD

1.1 Cystická fibrosa

Cystická fibrosa (CF) patří mezi nejčastější letální dědičně podmíněná onemocnění. Hlavní komplikací této choroby jsou rozsáhlé mikrobiální infekce plic, které vedou k jejich nevratnému poškození a následnému selhání vedoucím k úmrtí pacienta. Jedním z nejčastějších patogenů je bakterie *Pseudomonas aeruginosa*. Tato práce se zabývá vlivem slepičích protilátek IgY na schopnost zabránění adheze tohoto patogenu na buňky plicního epitelu pacientů s CF.

1.1.1 Charakteristika onemocnění

Cystická fibrosa je autozomálně recesivní onemocnění postihující zhruba jednoho z 2700 - 3800 novorozenců v České republice, což odpovídá evropskému průměru. Je způsobena mutací v genu *CFTR* kódujícím CFTR protein. Zhruba každý 26. – 33. jedinec je zdravým nosičem mutace tohoto genu [1]. Schéma dědičnosti je uvedeno na obrázku 1.



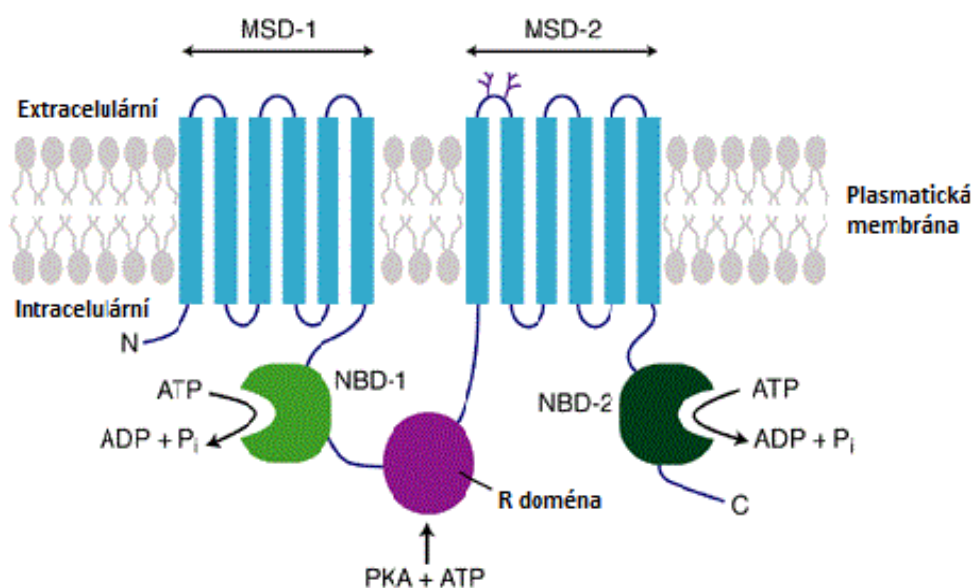
Obr. 1 – Autozomálně recesivní dědičnost cystické fibrosy

Pokud jsou oba rodiče nosiči mutace genu pro CF, pak je pravděpodobnost narození nemocného dítěte 25 % a pravděpodobnost narození zdravého dítěte též 25 %. Pravděpodobnost, že bude dítě zdravým nosičem mutace, je 50%; převzato a upraveno z [2].

1.1.2 CFTR protein

CFTR (z angl. cystic fibrosis transmembrane conductance regulator, volně přeloženo jako regulátor transmembránové vodivosti iontů) je protein s funkcí chloridového kanálu. Gen, který ho kóduje, obsahuje 27 kódujících exonů na 7. chromozomu v oblasti dlouhé cca 250 kb.

Protein kódovaný CFTR genem má funkci chloridového kanálu na apikální membráně exokrinních epitelálních buněk. Skládá se z 1480 aminokyselin a jeho molekulová hmotnost je zhruba 170 kDa. Tento protein je tvořen 5 doménami: dvě domény procházejí membránou, dvě vážou nukleotidy a pátá má regulační funkci. Struktura je znázorněna na obrázku 2. Transmembránové domény tvoří vlastní kanál, který spojuje cytoplasmatickou oblast s lumen exokrinních žláz a ukotvuje CFTR protein v membráně buněk. Domény, které vážou nukleotidy, jsou pohyblivé a umožňují otevírání a zavírání kanálu pomocí posunu regulační domény.



Obr. 2 - Model struktury CFTR kanálu

Protein se skládá ze 2 opakujících se motivů tvořených šesti doménami procházejícími membránou (MSD z ang. membrane-spanning domain) a nukleotid vázající doménou (NBD z ang. nucleotide-binding domain), které jsou odděleny regulační doménou (R). Místně řízená mutagenese MSD domény mění vodivost a propustnost CFTR, což značí, že tyto domény tvoří póry v buňce. Tento pór je držen zavřený pomocí R domény, která je v nefosforylovaném stavu. Fosforylace proteinkinasami (PK) jako např. PKA nebo PKC má dvojitý efekt: uvolňuje sterickou zábranu a stimuluje a usnadňuje interakci mezi NBD a ATP. Tato fosforylace je nutná pro otevření póru a může být zrušena intracelulárními fosfáty. Otevření póru vyžaduje hydrolýzu nukleotidtrifosfátu nukleotid vázající doménou následující fosforylaci R domény; převzato a upraveno z [3].

CFTR protein je součástí ABC rodiny transportérových proteinů (z ang. ATP – binding cassette), konkrétně se jedná o ABCC7. Pro aktivaci CFTR jako chloridového kanálu je klíčová fosforylace regulační domény proteinkinasou A, která je regulována cAMP, a hydrolýza ATP pomocí nukleotid vázající domény. Kromě funkce chloridového kanálu má CFTR protein vliv na regulaci funkce řady proteinů.

CFTR protein modifikuje funkci a vlastnosti dalších iontových transportérů, například inhibici transportu iontů sodíku přes sodné kanály v epitelu, regulaci chloridových a ATP kanálů, regulaci intracelulárního vezikulárního transportu, okyselení intracelulárních organel a inhibici endogenních, vápníkem aktivovaných chloridových kanálů. Také ovlivňuje $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ antiporter. Navíc má vliv na propustnost vody, transport ATP a sekreci hlenu. Hlavní princip patogeneze CF tedy spočívá ve snížené aktivitě až inaktivitě chloridových kanálů a zároveň zvýšené aktivitě sodných kanálů.

Fyziologicky prostupují Na^+ i Cl^- ionty membránami, osmoticky přenášejí vodu, a tím zajišťují hydrataci produktů exokrinních žláz. U CF je porušena resorpce Cl^- a zároveň není pomocí CFTR inhibován sodný kanál ENaC (z ang. epithelial Na channel), což vede k iontové nerovnováze v lumen vývodů exokrinních žláz, zahuštění sekretů a k poruše vrozené imunity, jejíž faktory jsou na rovnováhu iontů velmi citlivé.

CFTR protein má také funkci jako receptor pro endocytosu mikroorganismů, zejména *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhimurium* a *Aspergillus fumigatus*. Jeho mutací navíc dochází k okyselení fagosomů [4, 5, 6].

Bylo identifikováno více než 1900 možných změn v sekvenci CFTR genu, z nichž minimálně 1500 může způsobovat onemocnění. Frekvence jednotlivých mutací se liší mezi různými etnickými skupinami.

1.1.2.1 Klasifikace mutací CFTR genu

Různé mutace v CFTR genu mohou být rozděleny do 5 hlavních skupin podle vlivu na funkci výsledného proteinu:

- Třída I – Vadná syntéza proteinu

Do této třídy patří mutace, které vedou k narušení syntézy proteinu. Patří sem „nekódující“ (nonsense) mutace, například předčasné zařazení stop kodonu, posuny čtecího rámce, rozsáhlé delece a inserce.

- *Třída II – Nesprávné sbalení proteinu*

Protein je správně syntetizován, ale dochází k jeho nesprávnému sbalení a transportu do proteasomu. To vede k absenci výsledného proteinu na membráně. Zhruba 80 % pacientů má mutaci ze třídy II, sem patří i nejčastější mutace F508del.

- *Třída III – Nefunkční CFTR protein v membráně*

Protein je zabudován do membrány, ale je porušená regulace a nemůže docházet k průchodu chloridových iontů kanálem.

- *Třída IV – Snížená vodivost kanálu*

- *Třída V – Snížení počtu CFTR proteinů*

Dochází k výrazně sníženému počtu CFTR proteinů, které ale mají normální funkci v buněčné membráně. Patří sem i mutace, které částečně narušují správný sestřih proteinů [5, 7].

Efekt mutací je tkáňově specifický. Nejcitlivější je slinivka, potní žlázy, mužský reprodukční trakt (chámovod) a vedlejší nosní dutiny. Postižení plic je závislé nepřímo, zejména díky vlivu prostředí na bakteriální infekce [1].

1.1.3 Klinické příznaky

Absence, strukturní změny nebo nedostatečná funkce CFTR proteinu vedou k poruše transportu solí na sliznicích v dýchacích cestách, zažívacím a reprodukčním traktu, kde dochází k tvorbě hustého hlenu. Zároveň dochází k malabsorpci chloridových a sodných iontů v potních žlázách, která při zvýšeném pocení může vést k dehydrataci. Jednotlivé příznaky jsou velmi variabilní mezi pacienty podle jednotlivých mutací *CFTR* genu a zároveň jsou ovlivněny exogenními faktory jako je četnost infekcí, čistota vzduchu, imunoprophylaxe a v neposlední řadě stav výživy pacienta [8].

Dýchací ústrojí

V dýchacích cestách dochází k tvorbě hustého hlenu, který umožňuje růst bakterií a vznik infekcí, které vedou k záchvatům kašle. Časté jsou také záněty a infekce vedlejších nosních dutin. Dochází i k bronchitidám a zápalům plic. Dlouhotrvající infekce mohou vést k nevratnému poškození plic. Zhoršená funkce plic má za následek ztížené dýchání a záchvaty dušnosti. U některých pacientů může docházet k tvorbě nosních polypů, které musí být chirurgicky odstraněny.

Trávicí ústrojí

V trávicím ústrojí dochází vlivem hlenu k zablokování buněk v pankreatu, což má za následek snížení produkce trávicích enzymů. Nedostatek trávicích enzymů vede k nedokonalému trávení tuků a proteinů, které tělo nemůže zcela využít. Problém nastává zejména u dětí s CF, které špatně prospívají a nepřibývají na váze.

Špatné trávení vede k tvorbě objemné a mazlavé stolice nebo až k průjmům. U novorozenců dochází k blokaci střev tzv. mekoniovým ileem, která musí být chirurgicky řešena. S postupem choroby se dále mohou objevit pankreatitidy, prolaps rekta, hepatitidy, diabetes a žlučové kameny.

Reprodukční systém

Ženy s CF jsou plodné, ale je pro ně velmi těžké otěhotnět kvůli přítomnosti hustého hlenu, který blokuje vstup spermií. Muži s CF jsou neplodní, protože mají nefunkční chámovody.

Další symptomy

Nerovnováha elektrolytů způsobuje, že je pot pacientů s CF extrémně slaný díky vysokému obsahu vyloučených solí. To může při zvýšené námaze vést k dehydrataci organismu. Dochází také k řídnutí kostí (osteoporosa a osteopenie) a tvorbě paličkových prstů [9].

1.1.4 Diagnostika onemocnění

U CF je nutné diagnosu stanovit co nejdříve, aby bylo možné zahájit efektivní léčbu. Proto je od roku 2009 CF testována v rámci novorozeneckého „screeningu“ spolu s dalšími 12 chorobami.

Novorozenecký „screening“ je plošné preventivní vyšetření novorozenců, jehož cílem je odhalit léčebně ovlivnitelné choroby v jejich preklinickém stadiu, a tím pacientům zajistit včasnou léčbu a minimalizaci následků. Testování probíhá ze suché kapky kapilární krve odebrané novorozenci z paty na filtrační papírky [10].

Diagnostická kritéria pro potvrzení onemocnění jsou nálezy jednoho nebo více klinických příznaků charakteristických pro CF, rodinná anamnéza, pozitivní novorozenecký „screening“ a laboratorní průkaz abnormální funkce CFTR proteinu,

kteřá je potvrzena nálezem 2 patogenních mutací v *CFTR* genu, vysokou koncentrací chloridů v potu nebo *in vivo* prokázanou poruchou transportu elektrolytů.

Mezi standardní vyšetření patří potní test. Tato metoda spočívá ve stimulaci pocení pomocí pilokarpinové iontoforesy a následném sběru potu, ve kterém je stanovena koncentrace chloridových iontů. Zjištěná koncentrace chloridů nad 60 mM u dětí a 70 mM u dospělých s vysokou pravděpodobností svědčí o CF.

DNA získaná z krve pacienta může být testována pomocí molekulárně genetického vyšetření na přítomnost nejčastějších mutací *CFTR* genu. Tato metoda se využívá u vzorků z novorozeneckého „screeningu“.

Při potvrzení diagnózy CF se obvykle testují i blízcí příbuzní pacienta, aby se zjistila přítomnost mutací a riziko přenosu mutace na další generace [6].

1.1.5 Léčba

Cystická fibrosa je stále nevyléčitelná, ale v současnosti již léčitelná choroba. Základem léčby je kombinace optimální výživy, lékařské péče a léčebné rehabilitace. Léčba je pouze symptomatická, celoživotní a velmi intenzivní až agresivní. Cílem je co nejdéle udržet funkci plic a kvalitu života pacienta [11, 12].

Hlavní příčinou úmrtí pacientů s CF jsou chronické bakteriální infekce, které vedou k postupnému snižování dechového objemu. Přetrvávající infekce vedou k poškození plicní tkáně [13].

Základem léčby je udržení průchodnosti dýchacích cest pomocí inhalační terapie. K inhalacím jsou využívány inhalátory a nebulizátory s roztokem amiloridu, který blokuje reabsorpci sodíku z dýchacích cest. Dále je využívána rekombinantní lidská DNAasa, která zředí hlen tím, že rozkládá DNA z degradovaných neutrofilů. Inhalaci následuje respirační fyzioterapie k odstranění naředěného hlenu.

Důležitá je separace pacientů kolonizovaných různými patogeny. K léčbě bakteriálních infekcí jsou podávána intravenózní baktericidní antibiotika ve vysokých dávkách. Ke zvládnutí zánětlivých procesů v plicích jsou využívány kortikoidy, které ale nejsou vhodné pro dlouhodobé užívání. Místo nich je často podáváno makrolidové antibiotikum azitromycin, které má výrazné protizánětlivé účinky.

Riziko zhoršení funkce plic se zvyšuje i po virové infekci, proto jsou pacienti s CF očkováni podle běžného schématu, k němuž se přidává vakcína proti chřipce.

U nemocných s nedostatečnou plicní funkcí je využívána dlouhodobá domácí oxygenoterapie. Poslední možností je pak transplantace plic, která je ale omezena striktními kritérii výběru a nedostatkem dárců.

Pankreatická insuficience je kompenzována perorální substitucí pankreatických enzymů. Důležitá je také správná výživa, která má velký vliv na prognosu, kvalitu života a výskyt infekcí [11, 12].

Vznik specializovaných CF center poskytl pacientům multidisciplinární péči. Díky tomu se v současné době střední délka života pacientů s CF zvýšila na téměř 40 let a předpokládá se, že se v dnešní době narozené děti s CF již dožijí 50 let.

Nicméně, inhalace a užívání značného množství léků několikrát denně je pro pacienty velkou zátěží. Genová terapie k zavedení *CFTR* genu do epitelálních buněk dýchacích cest by byla ideální cestou k léčbě CF.

Genová terapie

Cílená léčba se v medicíně začala rozvíjet společně s pokroky v molekulárních technologiích a její hlavní výhodou je schopnost přizpůsobit léčbu genetickému profilu jednotlivce a vyhnout se tak nežádoucím účinkům.

V léčbě respiračních onemocnění nejsou zatím tyto postupy běžné z důvodu komplexity onemocnění. Výjimku tvoří právě cystická fibrosa, kde je genetický defekt velmi dobře definován jako mutace *CFTR* genu. Od objevení CFTR kanálu jako příčiny CF je snaha o cílenou genovou terapii vedoucí k nápravě mutace na buněčné úrovni. Předpokládá se, že k potlačení projevů CF je zapotřebí alespoň 50 % funkčních CFTR proteinů. Techniky genové terapie vyžadují přímou aplikaci vektoru na cílové buňky a zajištění jeho průchodu do jejich jader. Byly zkoumány a testovány virové i nevirové vektory k transportu DNA do buněk [14, 15].

Jako první byly zkoumány adenovirové vektory. Adenoviry jsou DNA viry, které způsobují nachlazení. Z virových částic byla odstraněna virová DNA a nahrazena DNA nesoucí gen pro CFTR. Tyto vektory nepronikají do jádra, ale zůstávají v cytoplasmě, proto je transfekce jen přechodná. Další nevýhodou je reakce imunitního systému na přítomnost virové částice a vznik zánětu.

Byly hledány jiné virové vektory, které by nenavozovaly odpověď imunitního systému. Nadějnými prostředky pro genovou terapii jsou v tomto ohledu lentiviry. Tyto vektory zatím ale nebyly testovány na pacientech.

Dalším typem jsou vektory nevirové povahy. Jako vektor se obvykle používá plazmid nebo nosná molekula, která dokáže přenést DNA do buňky. Potenciální výhoda oproti virovým vektorům je nižší imunitní odpověď při opakovaném podání. Byly testovány liposomy, což jsou fosfolipidové struktury tvořící vesikuly, ve kterých je uzavřena DNA. Tyto vektory nevyvolávají imunitní odpověď, ale transfekce buněk není příliš efektivní [15].

Vnesení mRNA

Problémy spojené s použitím vektorů pro vnesení DNA do buňky by bylo možno překonat použitím mRNA obsahující gen pro CFTR protein. Molekuly mRNA jsou do buněk transportovány pomocí částic na bázi polyethylenglykolu. Molekula mRNA je stabilizována úpravou 5' konce řetězce a pomocí inhibitorů RNAs. Tato metoda má řadu výhod – translace probíhá v cytoplasmě a mRNA tedy nemusí být transportována do jádra, mRNA konstrukt je mnohem menší než DNA a může být použit opakovaně bez vzniku vedlejších účinků. Nevýhodou je, že exprese klesá během několika dní, proto je nutná opakovaná aplikace.

Na plicních buňkách s mutací F508del bylo prokázáno, že po transfekci mRNA se výrazně zvýší počet CFTR kanálů na membráně buněk. Tato metoda by tedy mohla být další možností léčby cystické fibrosy [16].

Oprava mutantního proteinu

Metodou jak vyřešit základní problém CF je vývoj genotypově specifických nízkomolekulárních léčiv modulujících funkci CFTR proteinu. Byly zvoleny tři hlavní přístupy.

Prvním z nich jsou „potenciátory“ zvyšující funkci CFTR kanálů na apikálním povrchu epiteliálních buněk. Dojde k prodloužení času, po který je kanál otevřený a tím ke zvýšenému transportu iontů. Tyto látky jsou používány u mutací třídy III a IV, kde se CFTR protein dostane na membránu, ale je nefunkční.

Druhou skupinou jsou „korektory“, které zlepšují intracelulární zpracování proteinu u mutací třídy II a umožní více proteinům dostat se na membránu.

Poslední skupinou jsou „korektory produkce“ podporující čtení předčasně ukončených kodonů na mRNA a tím zvyšující produkci CFTR proteinu u mutací třídy I.

V roce 2012 začala léčba cystické fibrosy nízkomolekulární látkou s názvem ivacaftor (VX-770), která úspěšně opravuje funkci poškozeného CFTR kanálu u pacientů s některými mutacemi. Bylo prokázáno významné zvýšení transportu chloridů a zlepšení mukociliární clearance u pacientů s mutací Gly551Asp, kterou má zhruba 5 % pacientů. Ivacaftor je tzv. „potenciátor“ funkce CFTR kanálu a spolu s „korektorem“ lumacaftor byly v USA schváleny i pro použití u pacientů s nejrozšířenější mutací F508del.

Další skupinou léčiv jsou supresory předčasné terminace translace proteinu na ribozomu. Mezi tyto látky patří například aminoglykosidová antibiotika, která se váží na ribozom a zajistí, aby byl syntetizován celý protein. Účinky těchto sloučenin byly prokázány *in vitro*, na zvířecích modelech i pacientech. Nyní je ve druhé fázi klinického testování látka Ataluren. [14, 15, 17].

Vakcíny proti bakteriálním patogenům

Většina patogenů napadajících pacienty s CF, zejména *Burkholderia cepacia* komplex, *Pseudomonas aeruginosa* (PA) nebo *Mycobacterium abscessus*, patří mezi bakterie velmi rezistentní na léčbu antibiotiky. Momentálně není k dispozici žádná vakcína proti těmto patogenům.

Jednou účinnou terapií bakteriální infekce je v současné době podávání antibiotik. Bakterie se však po opakovaném užívání na antibiotika stávají rezistentní. Bakterie navíc mají různé kmeny s rozdílnými vlastnostmi a velmi snadno mutují.

Rezistence na antibiotika je hlavním problémem pacientů s CF. Multirezistentní kmeny *B. cepacia*, *P. aeruginosa* nebo *M. abscessus* často vedou k infekcím, které jsou letální. Různé vakcíny proti PA jsou v klinickém testování. Jsou testovány zejména vakcíny proti alginátu, bičíku a řadě membránových proteinů [18].

1.1.6 Imunita u pacientů s CF

U CF nebyly nalezeny žádné primární patologie ve funkci imunitního systému. Imunitní systém pacientů s CF na přítomnost infekce reaguje zcela adekvátně, ale další okolnosti CF patogenese znemožňují efektivní fungování imunitního systému a tím účinné odstranění patogenů. Stejně jako u zdravých jedinců reagují nejprve složky vrozené imunity, a ty jsou po aktivaci T a B lymfocytů následovány specifickými imunitními reakcemi [6].

Vrozená imunita

Vrozená imunita funguje jako bariéra a je prvním ochranným mechanismem reagujícím na vstup patogenu do organismu. Mezi jednotlivé funkční komponenty vrozené imunity patří neutrofily, makrofágy a epitelální buňky, které rozpoznávají, zpracovávají a likvidují patogeny a také produkují celou řadu antimikrobiálních látek.

Přestože CF není považována za primárně imunodeficientní onemocnění, mnoho složek vrozené imunity je u tohoto onemocnění pozměněno, zejména mukociliární clearance, produkce antimikrobiálních (poly)peptidů neutrofilů, makrofágů, a v neposlední řadě samotný kanál CFTR.

Významnou složkou vrozené imunity je mukociliární clearance, která chrání dýchací cesty. Neschopnost mutovaného CFTR kanálu efektivně sekretovat chloridové ionty z epitelálních buněk dýchacích cest do extracelulární tekutiny způsobuje výraznou absorpci vody z tekutiny dýchacích cest, což vede k výraznému zhoršení mukociliární clearance vznikem hustého hlenu v dýchacích cestách, který nemůže být efektivně odstraňován a usnadňuje kolonizaci bakteriálními patogeny.

Viskosní sekrety také mohou ucpat kanálky submukosních žláz a jejich produkty, mezi které patří např. bakteriolytické enzymy a β -defensiny, nemohou být sekretovány, což umožňuje kolonizaci a infekci respiračního epitelu bakteriemi.

Epitelální buňky využívají CFTR protein jako receptor k endocytose bakterií *Pseudomonas aeruginosa* a následnému odstranění z dýchacích cest. CFTR tedy může být považován za významnou součást mechanismů vrozené imunity a jeho mutace či deficit má přímou spojitost s infekcí *Pseudomonas aeruginosa* díky vytvoření prostředí vhodného pro adhezi a růst této bakterie.

Vysoká viskozita sekretů též u CF negativně ovlivňuje pohyb neutrofilů, které nemohou efektivně napadnout bakteriální patogeny a dochází ke vzniku chronické infekce. Neschopnost imunitního systému zabít bakterie v hustém hlenu má poté za následek hromadění buněk imunitního systému v místě infekce. Z těchto buněk se poté uvolňuje endobronchiální DNA, která ještě zvyšuje viskozitu hlenu, což vede ke zvýšené bakteriální adhezi a tvorbě biofilmu. Přehnaná imunitní odpověď na trvalou infekci způsobuje nejen poškození plicní tkáně, ale také přestavbu tkáně způsobenou působením proteas a růstových faktorů [19, 20].

Specifická imunita

Nejvýznamnější složkou specifické imunity jsou protilátky. Ani u specifické imunity nebyla u pacientů s CF zjištěna žádná deficeience, naopak často dochází k hypergamaglobulinemii [6].

Protilátky (imunoglobuliny) jsou glykoproteiny produkované imunitním systémem jako odpověď na přítomnost cizorodé látky, antigenu. Protilátky specificky rozpoznávají a vážou své antigeny s cílem jejich neutralizace a odstranění z organismu. Antigenem může být nízkomolekulární látka, ale i celý mikroorganismus.

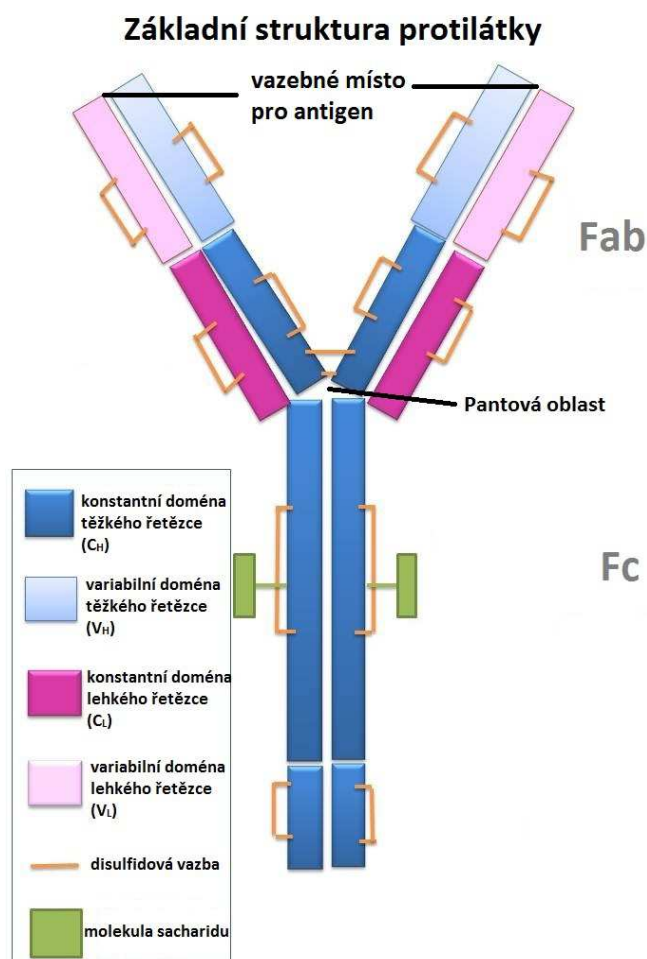
Imunoglobuliny jsou produkovány B-lymfocyty. Nejprve dojde k navázání antigenu na povrch B-lymfocytů, které se začnou dělit a po maturaci se z nich stanou plasmatické buňky produkující protilátky. Protilátka na antigenu specificky rozpoznává jeho část nazývanou epitop. Polyklonální protilátky jsou směsí protilátek obsahující protilátky od různých klonů B-buněk, které rozpoznávají jednotlivé epitopy na antigenu.

Základní stavba imunoglobulinů je stejná, ale navzájem se liší v částech vázajících antigen. Každá molekula imunoglobulinu je složená ze dvou párů polypeptidových řetězců tvořících tvar písmena Y. Rozlišujeme 5 základních typů imunoglobulinů: IgA, IgD, IgE, IgG a IgM. Nejvíce zastoupený je imunoglobulin G. Jeho molekula má velikost zhruba 155 kDa [21]. Struktura imunoglobulinu G je znázorněna na obrázku 3, na straně 13.

Dva těžké řetězce (H, z ang. heavy) jsou kovalentně spojené disulfidickými můstky a ke každému je ještě disulfidovou vazbou připojen lehký (L, z ang. light) řetězec. Těžké řetězce se skládají z několika domén, zpravidla čtyř nebo pěti, lehké se skládají ze dvou domén. Místo, kde jsou těžké řetězce mezi sebou spojeny disulfidovými můstky, se nazývá pantová oblast.

Domény na N-konci obou typů řetězců jsou variabilní (V_H , V_L), jejich struktura se liší mezi molekulami imunoglobulinů produkovanými různými klony B-lymfocytů. Variabilní domény společně vytváří vazebné místo pro antigen. Ostatní domény jsou konstantní (C_H , C_L). Molekulu protilátky lze rozštěpit proteolyticky papainem na fragmenty – dva Fab fragmenty a Fc fragment [22]. Fab fragment obsahuje část, která je zodpovědná za vazbu antigenu. Fc je konstantní část IgY nesoucí N-glykosidově

vázané sacharidové struktury. Navázání Fc fragmentu na receptor spustí další imunitní odpověď [23].



Obr. 3 – Struktura imunoglobulinu G

Molekula imunoglobulinu je složena ze dvou párů těžkých řetězců spojených v pantové oblasti. Na ně jsou vázány dva lehké řetězce. Každý typ řetězce se dále skládá z variabilních a konstantních domén. Variabilní domény jsou místem vazby antigenu; převzato a upraveno z [24].

1.1.7 Slepíčí protilátky

Ptáci mají 3 druhy imunoglobulinů: IgA, IgM a IgY. Imunoglobuliny typu A a M se vyskytují ve vaječném bílku, imunoglobulin Y je zejména v séru a vaječném žloutku, jejich hlavní rolí je ochrana embrya.

IgY jsou funkcí velmi podobné savčím IgG, ale mají částečně odlišnou strukturu. IgY mají díky vyšší molekulové hmotnosti domén těžkého řetězce a větší glykosylaci molekuly vyšší celkovou molekulovou hmotnost (okolo 167 kDa). Navíc jsou mnohem

rigidnější, ale zato odolnější vůči proteolytické degradaci a fragmentaci, a jsou velmi stabilní vůči teplotě a pH.

Slepičí protilátky se zdají být vhodnou alternativou k savčím protilátkám díky řadě výhod. IgY jsou ukládány do vaječného žloutku, odběr je tedy neinvazivní. Navíc díky velké fylogenetické vzdálenosti ptáků a savců je možná produkce protilátek i proti savčím epitopům, na které by produkční savci nebyli citliví. Tyto protilátky také neaktivují komplement a nezpůsobují zánět. Velkou výhodou je, že si patogeny na protilátky na rozdíl od antibiotik nemohou vytvořit rezistenci.

Slepice do žloutku produkují velké množství protilátek, cca 10 mg/ml. Slepice během měsíce snese zhruba 20 vajec, z nichž lze izolovat zhruba 2 g IgY, 2-10 % z tohoto množství jsou protilátky specifické vůči antigenu použitému při imunizaci.

Vejce jsou běžnou součástí našeho jídelníčku, a proto na ně imunitní systém nijak nereaguje. Pasivní imunizace pomocí IgY by tedy mohla být nadějnou cestou imunoterapie bez vedlejších toxických efektů.

Účinky IgY na snižování bakteriální a virové zátěže již byly prokázány pokusy na zvířatech i v klinických studiích na lidských pacientech a imunoterapie specifickými protilátkami se zdá jako vhodná alternativa k prevenci infekcí u lidí i zvířat [25].

Slepičí protilátky jsou vhodné například jako antiséra při hadím uštknutí, které jsou účinnější a lépe snášené než koňské. Orální podávání specifických slepičích protilátek se také ukázalo jako efektivní ochrana proti řadě střevních patogenů, jako jsou hovězí a lidské retroviry, koronaviry, *E. coli* a *Salmonella sp.* [26, 27, 28, 29, 30].

Slepičí protilátky byly také testovány jako prevence infekcí bakteriemi *Pseudomonas aeruginosa* u pacientů s CF. Jakmile u nich dojde ke kolonizaci PA, zbavení se této bakterie je téměř nemožné. Profylaktická léčba orálně podávanými protilátkami proti PA by mohla být cestou k prevenci chronických infekcí PA u pacientů s CF.

Bylo zjištěno snížení adherence bakterií na lidské epiteliální buňky *in vitro*, snížil se výskyt infekce PA a při kolonizaci nedocházelo k tvorbě mukoidního kmenu. IgY jsou tedy efektivní při dlouhodobé imunoterapii bez negativních vedlejších efektů [25].

1.1.8 Změny glykosylace u CF

Jedním z hlavních znaků CF je změna struktury glykoproteinů buněčného povrchu. Abnormální glykosylace sekretovaných a v membráně vázaných mucinů dýchacích cest souvisí s bakteriální infekcí a zánětem v dýchacích cestách CF pacientů. Je známo, že PA a další pro CF typické bakterie, používají pozměněné glykanové struktury mucinů jako receptory pro svou vazbu pomocí adhezínů, především lektinů, které tyto struktury specificky rozeznávají.

Mukosní sekrety a řasinky na apikální straně epitelálních buněk v lumen dýchacích cest jsou velmi bohaté na glykosylované muciny. Muciny jsou hlavní proteinové struktury povrchů buněk dýchacích cest a jejich řasinek. Jedná se o glykoproteinové makromolekuly s velikostí v řádu MDa, které obsahují rozsáhlé oblasti bohaté na serin a threonin, na které jsou *O*-glykosidicky vázané glykanové struktury.

O-glykany, vyskytující se v lidských mucinech, mají velmi variabilní velikost, od disacharidů až po rozsáhlé větvené struktury, a obsahují různé typy sacharidových zbytků jako je např. galaktosa, fukosa, *N*-acetylglukosamin nebo kys. sialová. *N*-glykosylace není v mucinech tak obvyklá.

Největšími producenty mucinů jsou pohárkové buňky a submukosní žlázy v průduškách. Sekretované muciny se přes disulfidové vazby mezi proteiny spojují v oligomerní komplexy, naproti tomu muciny vázané v membráně buněk dýchacích cest jsou menší a polymerní struktury netvoří.

Muciny u zdravých jedinců svými vlastnostmi přispívají k funkci imunitního systému záchytem bakterií, které jsou následně odstraněny fagocyty buňkami nebo pohybem řasinkového epitelu. U CF dochází díky zvýšenému počtu mukosních žláz k nadměrné sekreci vysoce viskosního hlenu, který blokuje dýchací cesty a není odstraňován pomocí mukociliární clearance. Toto prostředí se poté stává vhodným médiem ke kolonizaci a růstu bakterií.

U řady tkání a tělních tekutin pacientů s CF, včetně sekretovaných a membránových mucinů, byly zjištěny změny normální glykosylace. Sekretované muciny mají sníženou fukosylaci, sulfataci a zvýšenou sialyzaci. U membránových mucinů bylo zjištěno snížení celkové glykosylace, snížení sialyzace a zvýšení fukosylace.

Patogeny jako *P. aeruginosa* mají na svém povrchu specifické glykosidasy, které mohou pozměnit glykosylaci hostitelských mucinů a odkrýt glykanové receptory, které následně využijí k vazbě na buňku. Přítomnost bakterií způsobí zánět plic a rozšíření zánětu, který má také vliv na změny glykosylace. Na místě vzniklého zánětu se poté hromadí leukocyty, B-buňky a makrofágy, které ještě přispívají k poškození plicní tkáně [31].

1.2 Bakterie napadající pacienty s CF

Prostředí dýchacích cest je velmi bohaté na muciny, na které se váží patogeny, a dochází tak k infekci. Vysoce viskosní hlen, který nemůže být z dýchacích cest přirozeně odstraněn pomocí mukociliární clearance, hypoxické prostředí, neefektivní působení imunitní odpovědi a pozměněné prostředí přispívají k vyšší náchylnosti dýchacích cest k infekci bakteriemi [31].

Respirační selhání v důsledku chronické infekce a zánětu dýchacích cest je nejčastější příčinou úmrtí pacientů s CF. Mezi hlavní patogeny napadající tyto pacienty patří *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Haemophilus influenzae* a *Burkholderia cepacia* komplex [32].

1.2.1 *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa je oportunní patogen způsobující akutní a chronické infekce, zejména u pacientů s CF, který dokáže zpracovat široké spektrum živin a je schopný adaptovat se na různé životní podmínky. Možnosti léčby těchto infekcí jsou velmi omezené, protože bakterie vykazují vysokou rezistenci vůči většině běžně používaných typů antibiotik. Navíc dokážou tvořit biofilm, který je chrání před účinky antibiotik a imunitního systému [33].

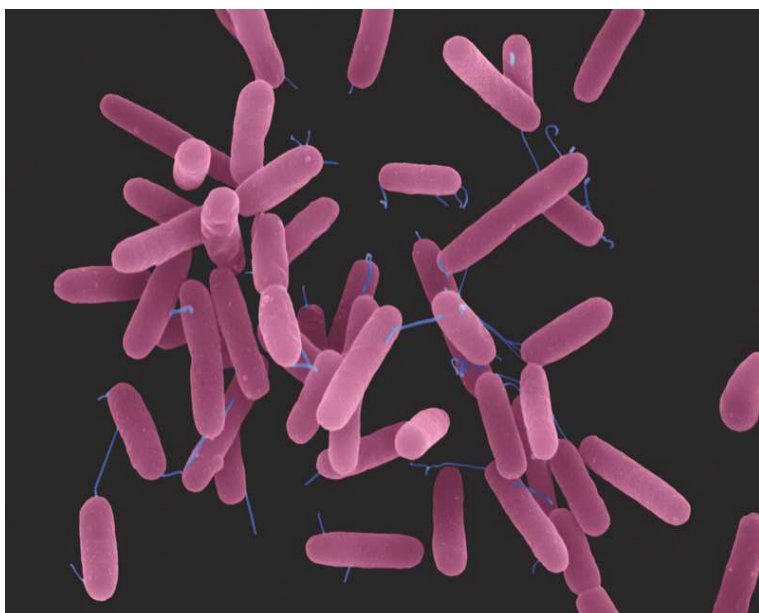
PA je nejčastějším patogenem napadajícím pacienty s CF, v dospělosti je tímto patogenem chronicky infikováno až 80 % nemocných [6].

1.2.1.1 Charakteristika patogenu

Pseudomonas aeruginosa je gram negativní aerobní tyčinkovitá bakterie o velikosti

1,5 – 3 μm . Pohybuje se pomocí polárního bičíku. Vzhled bakteriálních buněk PA je znázorněn na obrázku 4. Klinické izoláty mají obvykle ještě pili, které pomáhají bakteriální adhezi a kolonizaci hostitele.

PA jsou bakterie přítomné ve vodě i v půdě a běžně se vyskytují i v nemocničním prostředí [34].



Obr. 4 – Bakterie *Pseudomonas aeruginosa* [35]

PA má nefermentativní aerobní metabolismus. Dokáže metabolizovat velké množství organických sloučenin, ale může růst i v anaerobním prostředí, kde jako akceptor elektronů pro respiraci využívá dusičnan. Nejlépe roste při 25°C–37°C, ale dokáže přežít ve velkém rozmezí teplot. Také je schopná odolávat vysokým koncentracím solí, barviv, slabých antiseptik a běžných antibiotik.

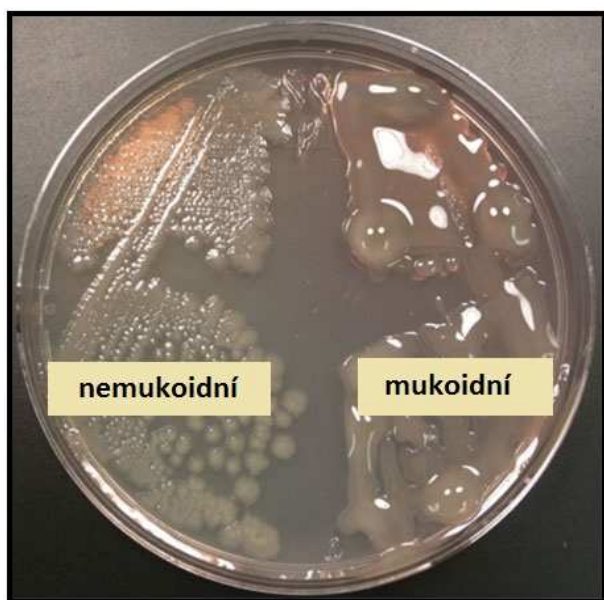
Během infekce roste PA v plicích CF pacientů v mikroaerobních a anaerobních podmínkách. Růst v podmínkách s nedostatkem kyslíku vede k fyziologickým změnám PA, která začne produkovat alginát a změní se stavba její vnější membrány, čímž se stane více rezistentní.

Většina kmenů PA produkuje různé typy pigmentů, nejčastěji pyocyanin a fluorescein. Také dochází k produkci extracelulárních proteas, které se podílejí na destrukci tkání [34, 36, 37].

PA způsobuje infekce močových a dýchacích cest, dermatitidy, infekce měkkých tkání, bakteremie, infekce kloubů a kostí, infekce zrakového a sluchového aparátu, gastrointestinální infekce a u imunosuprimovaných pacientů může vést až k rozsáhlým systémovým infekcím [38].

V případě poškození hostitelské tkáně většinou vykazují pozměněnou glykosylaci. U cystické fibrosy vede mutace *CFTR* genu ke změněnému pohybu iontů a zároveň ovlivňuje *N*-glykosylaci CFTR proteinu a dalších buněčných glykoproteinů. Zvýšená fukosylace a snížená sialyzace se zvýšenou hladinou Lewis^X a Lewis^A epitopů umožňuje snadnější a silnější vazbu PA na hostitelské buňky [39].

Pseudomonas aeruginosa se mohou vyskytovat ve třech typech kolonií. Izoláty z půdy a vody tvoří malé, drsné kolonie, zatímco klinické vzorky jeden ze dvou typů hladkých kolonií. První typ je hlenovitý, což je způsobeno produkcí extracelulárních polysacharidů, zejména alginátu. Tento typ je většinou izolován z močových a dýchacích cest pacientů. Druhý typ je hladký a zvýšený [40]. Vzhled kolonií z klinických vzorků je na obrázku 5 na straně 19. Kmeny PA izolované z pacientů s CF jsou obvykle mukoidní a produkují velké množství extracelulárních polysacharidů [34].



Obr. 5 – Kolonie *Pseudomonas aeruginosa*; převzato a upraveno z [41]

1.2.1.2 Adhezivní struktury PA

Virulence bakterie *Pseudomonas aeruginosa* je spojena s její schopností adherovat na povrchy hostitelských buněk, tvořit biofilm a vylučovat hydrolytické enzymy a toxické látky.

Hlavní roli u virulence bakterií hrají sacharidy, a to jak na bakteriálních, tak hostitelských buňkách. Hostitelské sacharidy, zejména muciny na sliznicích a glykokonjugáty, na povrchu buněk působí jako specifické cíle pro navázání patogenu a podílí se tak na vzniku infekce.

Selektivita bakterií závisí na specifičnosti jejich lektinů a adhezínů vůči hostitelským sacharidům. Přestože některé z proteinů, které vážou sacharidy byly důkladně studovány, jejich přesná role v rozpoznávání a adhezi na hostitelské buňky dosud nebyla plně objasněna. Bylo identifikováno několik typů receptorů na hostitelských buňkách.

Flagellin a flagelární protein FliD rozpoznávají mucinové oligosacharidy, adheziny na pilích hrají neméně důležitou roli v adhezi zprostředkované sacharidy.

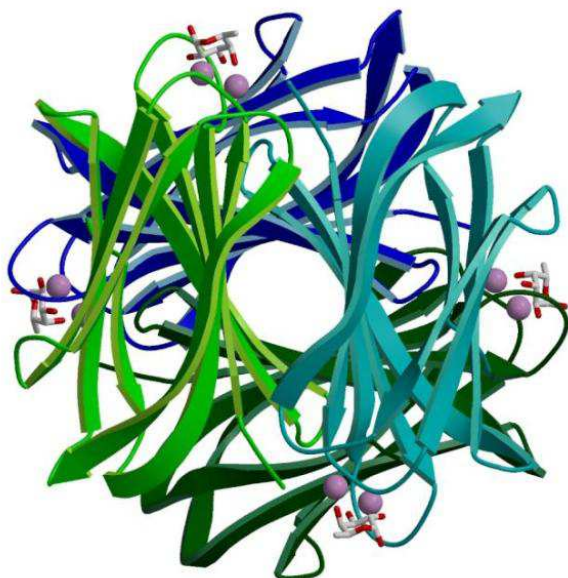
Jedním z klíčových faktorů adheze jsou lektiny, proteiny neimunitní povahy, které specificky rozpoznávají a vážou sacharidové struktury. Vyskytují se v mnoha organismech od virů po živočichy a hrají důležitou roli v mezibuněčné interakci. Bakterie využívají lektiny jako adhezivní struktury k vazbě na glykosylované proteiny hostitelských buněk. *Pseudomonas aeruginosa* tvoří dva typy lektinů, PA-IL a PA-IIL.

Lektin PA-IL, o velikosti 51 kDa, se skládá ze čtyř podjednotek složených ze 121 aminokyselin. Selektivně váže D-galaktosu a její deriváty. Lektin PA-IIL má velikost 47 kDa, je také tetramerní a každá jednotka obsahuje 114 aminokyselin. Tento lektin váže specificky L-fukosu a D-manosu.

Oba lektiny se vyskytují v cytoplasmě, periplasmě a ve velkém množství na vnější membráně bakteriálních buněk. Ve vazebném místě obsahují ionty vápníku, které se účastní přímé vazby na sacharid. Po navázání na buňky dýchacích cest inhibují pohyb řasinkového epitelu, a tím imobilizují hlen v dýchacích cestách. Také hrají důležitou roli při tvorbě biofilmu.

Bylo zjištěno, že lektin PA-IL v koncentraci vyšší než 10 µg/ml má cytotoxický efekt na epitelální buňky dýchacích cest, a tím že snižuje rychlost jejich růstu [31, 33, 42].

PA-IIL lektin bakterie PA patří k jejím nejvýznamnějším virulentním faktorům. Má vysokou afinitu pro L-fukosu ($K_A = 1,6 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}$) [43] a pro glykany typu Lewis^x ($K_A = 4,7 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}$) [31]. Jeho struktura je na obrázku 6.



Obr. 6 – Struktura lektinu PA-IIL [44]

V komplexu PA-IIL/fukosa je fukosový zbytek zavřen mezi dvojicí vápenatých iontů. Na koordinaci vápenatých iontů se podílí tři hydroxylové skupiny fukosy [39].

2 Cíl práce

V práci byl zkoumán vliv slepičích protilátek IgY na adherenci bakterií *Pseudomonas aeruginosa* na plicní epiteliální buňky. Pro splnění tohoto cíle bylo třeba řešit následující dílčí úkoly:

- prokázat funkčnost protilátky proti PA-IIL pomocí metody ELISA
- pomocí specifické protilátky ověřit produkci PA-IIL bakteriálními kmeny technikou „Western blotu“
- zjistit vliv kontrolních a specifických protilátek na adhezi bakterií na plicní epiteliální buňky
- posoudit vliv barvení na schopnost adherence za pomoci luminiscenčního kmenu *Pseudomonas aeruginosa*
- srovnat protekční efekt protilátek na adherenci různých bakteriálních kmenů *Pseudomonas aeruginosa*
- zkoumat vliv preinkubace plicních buněk s rekombinantním bakteriálním lektinem PA-IIL na adherenci bakterií

3 Materiál a metody

3.1 Použitý materiál a přístroje

3.1.1 Přístroje

analytické váhy 40 SM	PESA, Švýcarsko
aparát pro horizontální přenos Fast Blot B43	Biometra, Německo
autokláv Varioklav®	H+P Labortechnik GmbH, Německo
centrifuga Eppendorf 5415R	Eppendorf, USA
centrifuga MicroStar 12	VWR Labogene Aps, Dánsko
centrifuga Hettich Universal 320 R	Hettich Zentrifugen, Německo
CO ₂ inkubátor	ShellLab, ČR
čtecí zařízení ELISA Sunrise Remote	TEKAN, Rakousko
elektroforetická aparatura Mini-PROTEAN®	BioRad, USA
Tetra Cel	
inkubátor s funkcí třepání	New Brunswick Scientific, USA
laminární box BIO 126	Labox, ČR
laminární box MB 20	Labox, ČR
mikroskop Motic AE31	Motic, Německo
mikroskop Nikon ECLIPSE TE2002-U	Nikon, Japonsko
s programem NIS-Elements AR 2.30	
minicentrifuga Spectrafuge™	Labnet, USA
sonikátor Sonopuls HD 3100	Bandelin, Německo
spektrofotometr Helios alpha	Thermo Scientific, Velká Británie
spektrofotometr Sunrise Absorbance Reader	Tecan, Švýcarsko
spektrofluorimetr Tecan Infinite M200 Pro	Tecan, Švýcarsko
s programem i-control	
termoblok Mini Dry Bath	MiuLab, Čína
vodní lázeň	Memmert, Německo

zamrazovací box Nalgene™ Cryo 1°C

Nalgene®

Freezing Container

zdroj pro elektroforesu

BioRad (USA)

3.1.2 Materiál

- *ARTIFEX Instant s.r.o.(ČR)*

Sušené mléko Laktino

- *Bemis (USA)*

parafilm

- *BioRad (USA)*

marker Mr (Precision Plus Protein™ Dual Color Standard); „p-nitrotetrazolium blue“ (NBT); 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl fosfát (BCIP); Immun-Blot®PVDF Membrane for Protein Blotting

- *Biohit (UK)*

MidiPlus pipetovací nástavec; špičky

- *Corning (USA)*

destičky CellBind® 24 jamek; plastové zkumavky; jednorázové sterilní pipety; kryozkumavky, sterilní filtry (0,22 µm)

- *Fluka (Švýcarsko)*

akrylamid; dodecylsulfát sodný (SDS); 2-merkaptoethanol; TWEEN®20; N,N-methylen-bis-akrylamid (BIS); tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris)

- *Gibco™ Invitrogen (UK)*

LHC-9 médium; PBS tablety pro přípravu PBS pufru; Geneticin

- *Hartmann (ČR)*

nitrilové rukavice

- *Chemos (ČR)*

AguaClean;

- *Lachema Brno (ČR)*

bromfenolová modř; ethanol; NaOH; Na₂HPO₄·12H₂O; NaCl; NaH₂PO₄·2H₂O; glycerol; kyselina octová

- *Lonza Biotec s.r.o. (Švýcarsko)*

D-Tube™ Dialyzer Mini-Maxi (6-8 kDa, 12-14 kDa) dialyzační tuby; FBS

- *Merck Milipore (Německo)*

sterilní mikrofiltry 0,22 µm

- *PAA Laboratories (Rakousko)*

trypsin-EDTA 10x koncentrovaný roztok

- *Serva (Německo)*

Tris (base); Triton X-100; N,N,N',N-tetramethylethyldiamin (TEMED); Coomassie Brilliant Blue R-250

- *Sigma-Aldrich (USA)*

sekundární králičí protilátka konjugovaná s alkalickou fosfatase; Collagen type IV from human placenta; PKH67 Green Fluorescent Cell Linker Mini Kit for General Cell Membrane Labelling; PKH26 Red Fluorescent Cell Linker Mini Kit for General Cell Membrane Labelling

- *TPP (Švýcarsko)*

kultivační lahve 12,5 – 25 cm²

- *Whatman (USA)*

filtrační papír

3.2 Práce s tkáňovými kulturami

Pro práci byly použity buněčné linie plicních buněk NuLi-1 a CuFi-1. CuFi-1 jsou immortalizované buňky plicní tkáně pacienta s cystickou fibrosou (homozygot pro F508del) a NuLi-1 jsou immortalizované buňky plicní tkáně zdravého jedince. Obě tyto linie byly pěstovány v kultivačních lahvích s povrchem potaženým kolagenem z lidské placenty, v 37°C a 5% CO₂. Veškerá práce s buněčnými kulturami probíhala sterilně v místnosti pro tkáňové kultury, aby bylo co nejvíce sníženo riziko kontaminace.

S oběma liniemi buněk bylo zacházeno podle produktového listu a webových zdrojů [45, 46].

Spotřební materiál (špičky k automatickým pipetám, pufrý) byl sterilizován v autoklávu (121°C, 20 minut), ostatní materiál (kultivační lahvičky, zkumavky Falcon, kryozkumavky, plastové pipety) byl používán jednorázový sterilní.

3.2.1 Zamražení buněčných linií

Buněčné linie byly uchovávány hluboce zmrazené v kapalném dusíku pro dlouhodobé uchování a v hlubokomrazícím boxu (-80°C) pro krátkodobé uchování. Zamražení kromě kryokonzervace zajišťuje i genetickou stabilitu linií.

Buňky pro zamražení byly převedeny do suspenze jako při „pasáži“ (viz kap. 3.2.4). Po centrifugaci byla peleta centrifugačně promyta pomocí PBS (1000 RPM, 5 minut, centrifuga Hettich Universal 320R). Peleta byla resuspendována v zamrazovacím médiu (LHC-9 médium, 30% v/v FBS, 10% v/v dimethylsulfoxid (DMSO)) a buněčná suspenze rozdělena po 1 ml do označených kryozkumavek. Kryozkumavky byly pevně uzavřeny a umístěny v zamrazovacím boxu Nalgene™ Cryo 1°C Freezing Container přes noc do hlubokomrazícího boxu. V tomto zamrazovacím boxu je garantováno postupné ochlazování o 1°C za minutu. Pro dlouhodobé skladování byly po zamražení linie uskladněny v kapalném dusíku.

3.2.2 Rozmražení buněčných linií

Buněčné linie jsou uchovávány zmrazené v kapalném dusíku pro dlouhodobé uchování a v hlubokomrazícím boxu pro krátkodobé uchování. Jako kryoprotektant se

používá DMSO. Tato látka je však pro buňky toxická, proto musí rozmrazení probíhat velmi rychle a podle přesného schématu.

Bylo připraveno kompletní médium ve složení: LHC-9 médium s přidaným Geneticinem v koncentraci 50 µg/ml (zásobní roztok 50 mg/ml), dále nazývané jako kompletní médium. Médium bylo temperováno na 37°C. Kryokonzervy s buňkami z kapalného dusíku/hlubokomrazícího boxu byly rychle rozmrazeny ve vodní lázni (37°C) a sterilně převedeny do zkumavky. K buňkám bylo následné po dobu 10 minut přidáváno médium temperované na 37°C, vždy po 1 minutě dle schématu uvedeného v tabulce 1. Postupné přidávání média umožní citlivým buněčným liniím lepší adaptaci na změnu osmolarity a pH.

Tab. 1 - Schéma přidávání média k rozmraženým buněčným liniím

1 ml zamražených buněk	přídavek média po minutě (ml)									
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
	0,10	0,12	0,15	0,19	0,26	0,36	0,52	0,86	1,69	4,75

Buněčná suspenze byla centrifugována (1000 RPM, 5 minut, centrifuga Hettich Universal 320R). Peleta byla resuspendována v kompletním médiu a převedena do kultivační lahve (růstová povrch 25/75 cm²) s povrchem potaženým kolagenem (kolagen IV z lidské placenty, viz kap. 3.2.6) a odpovídajícím množstvím kompletního média (10 ml pro 25 cm², 15 ml pro 75 cm²). Z buněčné suspenze bylo ještě odebráno 20 µl pro stanovení počtu buněk a jejich viability.

3.2.3 Kultivace buněčných linií

Buněčné linie byly kultivovány v inkubátoru ShellLab při 37°C a 5% CO₂. Obě linie jsou adherentní a pro svůj růst vyžadují růstový povrch potažený kolagenem IV [45, 46]. Pro kultivaci bylo používáno bezsérové růstové médium LHC-9 s fenolovou červení jako indikátorem pH [47]. Do LHC-9 média byl přidáván Geneticin (G418) v koncentraci 50 µg/ml (zásobní roztok 50 mg/ml). Geneticin je antibiotikum a zároveň funguje jako selekční agens geneticky modifikovaných buněk [48].

Buňky byly pěstovány v kultivačních lahvích s povrchem potaženým kolagenem typu IV (viz kap. 3.2.6.). Pro adhezní testy byly linie pěstovány na destičkách Corning CellBind, kde kultivace probíhala na povrchu bez kolagenu. Tato kultivace byla velmi krátká, proto na vlastnosti buněk neměla vliv.

3.2.4 Subkultivace linií

Subkultivace neboli „pasáž“ znamená snížení hustoty buněk převedením na nové kultivační médium. Linie, které jsou adherentní se používají, když vytvoří monovrstvu, tzv. „monolayer“. Pro uvolnění buněk z kultivačního povrchu byl použit 0,25% (w/v) trypsin s EDTA (0,53 mM). K zastavení působení trypsinu na buňky bylo použito fetální bovinní sérum (FBS).

Pasáž byla prováděna v době, kdy buňky vytvořily monovrstvu, čemuž odpovídá zhruba doba 5 – 7 dní. Médium bylo měněno každé 2 – 3 dny. Byla vedena evidence o počtu pasáží. U použitých linií je doporučeno maximálně 15 pasáží po rozmražení, aby byly zachovány deklarované vlastnosti.

Buňky byly ponechány růst až do vytvoření monovrstvy. Následně z nich bylo odebráno kultivační médium a přidány 2 – 3 ml 0,25% (w/v) roztoku trypsinu s EDTA (0,53 mM). Buňky s trypsinem byly inkubovány zhruba 10 minut při 37°C. Poté byly přidány 2-3 ml 1% (v/v) roztoku FBS v PBS. Kultivační povrch byl několikrát opláchnut, aby došlo k uvolnění všech buněk. Vzniklá buněčná suspenze byla centrifugována (1000 RPM, 5 minut, centrifuga Hettich Universal 320R) a peleta resuspendována v 1 ml kompletního média. Ze suspenze byl odebrán vzorek k určení počtu buněk a alikvoty ze suspenze nasazeny do nových kultivačních lahví potažených kolagenem IV.

3.2.5 Určení viability a množství buněk pomocí barvení trypanovou modří

Trypanová modř je barvivo využívané k zjištění viability buněk. Živé buňky barvivo aktivně vylučují, a proto zůstávají bezbarvé, zatímco mrtvé buňky jsou obarveny na modro. Pro určení počtu buněk v suspenzi byl používán hemocytometr (Bürkerova komůrka) a mikroskop Motic. Z buněčné suspenze bylo odebráno 20 µl a smícháno s 20 µl 0,4% (w/v) trypanové modři. Ze vzniklé suspenze bylo odebráno 20 µl a naneseno na mřížku hemocytometru, která byla umístěna pod mikroskop, a buňky byly počítány. Bylo vždy počítáno 5 velkých čtverců a následně vypočten průměr. Počítány byly buňky uvnitř čtverců a na pravém a horním okraji a to pouze ty, které nebyly barvivem obarvené namodro.

Počet buněk byl následně vypočítán ze vztahu:

- $n = \text{průměrný počet buněk ve velkém čtverci} \cdot \text{ředění} \cdot 10^4$

3.2.6 Potažení kultivačních nádob kolagenem

Plicní buněčné linie NuLi-1 a CuFi-1 pro svůj růst potřebují kultivační povrch potažený kolagenem IV z lidské placenty. Tento kolagen se uchovává lyofilizovaný hluboce zmrazený. Byl připraven zásobní roztok o koncentraci 1,8 mg/ml rozpuštěním v 0,25% (v/v) kyselině octové. Tento roztok byl následně uchováván v chladu ve skleněné zatemněné lahvičce.

Pro potahování povrchu kultivačních lahví byl připraven roztok o koncentraci 60 µg/ml naředěním zásobního roztoku pomocí PBS nebo destilované vody. Roztok byl sterilizován filtrací přes filtr (0,22 µm). Roztok byl nanášen do kultivačních lahví v množství 4–5 ml na 75 cm² nebo 2 ml na 25 cm² tak, aby byl pokrytý celý kultivační povrch. Lahve s roztokem byly inkubovány v laminárním boxu po dobu 12-18 hodin. Následně byl roztok kolagenu oddělen a kultivační povrch promyt 3x PBS. Lahve byly ponechány vyschnout dnem vzhůru, aby se zabránilo vzniku krystalů PBS na kultivačním povrchu. Vyschlé lahve byly sterilizovány UV zářením po dobu minimálně 3 hodin. Víčko bylo poté zajištěno pomocí parafilmu a lahve dále skladovány v chladu. Před použitím byl kultivační povrch ještě jednou promyt PBS.

3.3 Práce s bakteriálními kmeny *Pseudomonas aeruginosa*

K práci bylo k dispozici 7 kmenů *Pseudomonas aeruginosa*:

- PAK - ST 1763
- PA lux – bioluminiscenční kmen *Pseudomonas aeruginosa*
- PA 966 – kmen *Pseudomonas aeruginosa* izolovaný z pacienta s CF (ST 966)
- PA 1003 - kmen *Pseudomonas aeruginosa* izolovaný z pacienta s CF (ST 1003)
- PA 1022 - kmen *Pseudomonas aeruginosa* izolovaný z pacienta s CF (ST 1022)
- PA 01 - referenční sbírkový kmen *Pseudomonas aeruginosa* (ST 549)
- PA CF – zatím nezařazený kmen *Pseudomonas aeruginosa* izolovaný z pacienta s CF

Kmen PAK je nazýván kontrolní, protože na něm byla prováděna optimalizace metody [49] a většina porovnávacích experimentů a proto nám slouží jako referenční pro ostatní kmeny. Kmen PA01 je referenční sbírkový kmen *Pseudomonas aeruginosa* (ST 549).

Ke kultivaci bakterií byly používány dva druhy kapalných médií – plné médium (PS) a minimální médium (M9). Při kultivaci v médiu M9 by mělo docházet ke stimulaci tvorby lektinu PA-IIL [50]. Média byla sterilizována autoklávováním. Bakterie byly kultivovány při 37°C za středních otáček třepání.

PS médium: 1,6% (w/v) pepton; 1% (w/v) enzymatický kaseinový hydrolyzát; 57 mM K₂SO₄; 15 mM MgCl₂; 0,5% (v/v) glycerol

M9 médium: 16,8 mM Na₂HPO₄; 22 mM KH₂PO₄; 5 mM NaCl; 49 mM NH₄Cl; (sterilizováno v autoklávu 20 min při 121°C); 2 mM MgSO₄; 0,1 mM CaCl₂; 0,2% (w/v) glukosa; (sterilizováno přes mikrobiální filtr porosity 0,22 μm)

Koncentrace bakteriálních buněk v suspenzi byla určována fotometricky pomocí měření optické denzity při 600 nm (spektrofotometr Helios α). Pro výpočet koncentrace byl použitý převodní vztah:

- $CFU = A_{600} \cdot 6 \cdot 10^8$

CFU ... koncentrace bakterií v ml (z ang. Colony-forming unit)

3.3.1 Zamražení bakteriálních linií

Pro dlouhodobé uchování byly bakterie zamrazeny a uchovávány v hlubokomrazícím boxu při -80°C .

K bakteriím namnoženým v plném médiu na hustotu zhruba $5 \cdot 10^9$ b/ml bylo přidáno v poměru 1:1 kryoprezervační médium ve složení: 40% (w/v) glycerol v PBS (sterilizováno přes mikrobiální filtr porosity $0,22\ \mu\text{m}$). Suspenze byla alikvotována po 200 μl do mikrozskumavek Eppendorf a rychle zamrazena v kapalném dusíku. Následně byly „konzervy“ skladovány v hlubokomrazícím boxu.

3.4 Fluorescenční značení buněk

K fluorescenčnímu značení buněk byly použity sloučeniny PKH67 a PKH26 od firmy Sigma. Obě tyto sloučeniny obsahují ve své molekule dlouhé alifatické řetězce, kterými se váží do lipidových částí membrány buněk. Výrobce deklaruje schopnost fluorescence barvených buněk několik týdnů u PKH26 a 10 – 12 dní v případě PKH67. Postup barvení byl převzat z produktových listů jednotlivých fluorescenčních sond s drobnými úpravami dle [50].

3.4.1 Fluorescenční značení bakteriálních buněk pomocí PKH26

Sloučenina PKH26 poskytuje fluorescenci v červené oblasti spektra, její excitační maximum je 551 nm a emisní maximum 567 nm. Tyto hodnoty byly upraveny na Ex: 522 nm a Em: 569 nm, aby nedocházelo k překryvu fluorescence s barvou PKH 67.

Bakterie byly nasazeny do příslušného růstového média a ponechány narůst přes noc. Poté byly centrifugovány (12000 RPM, 5 minut, Eppendorf Centrifuge 5415R) a ještě dvakrát centrifugačně promyty PBS od zbytků média (12000 RPM, 5 minut, Eppendorf Centrifuge 5415R). Bylo připraveno 250 μl 20 μM roztoku barviva PKH26. Supernatant po centrifugaci byl kompletně odebrán a peleta byla resuspendována ve 250 μl Diluentu C. K buněčné suspenzi byl přidán připravený roztok barviva, směs důkladně promíchána a ponechána inkubovat za laboratorní teploty a občasného promíchání 30 minut bez přístupu světla.

Po ukončení inkubace bylo barvení zastaveno přidáním cca 500 μl 1% (w/v) BSA v PBS. Směs byla poté centrifugována (13000 RPM, 10 minut, Eppendorf

Centrifuge 5415R) a peleta ještě dvakrát centrifugačně promyta pomocí PBS (12000 RPM, 5 minut, Eppendorf Centrifuge 5415R).

Výsledná fluorescence byla měřena na spektrofluorimetru Tecan Infinite M200 Pro při vlnových délkách Ex/Em: 522/569 nm, čtení destičky zespoďu, vícenásobné čtení jamky: vyplněný kruh 4x4, gain 140 – 160. Fluorescence byla dále hodnocena na mikroskopu Nikon Eclipse, filtr 31002 RdiI C87702.

3.4.2 Fluorescenční značení plicních buněk pomocí PKH67

Sloučenina PKH67 poskytuje fluorescenci v zelené oblasti spektra, její excitační maximum je 490 nm a emisní maximum 502 nm. Tyto hodnoty byly upraveny na Ex: 470 nm a Em: 505 nm, aby nedocházelo k překryvu fluorescence s barvou PKH 26.

Pro barvení je nutné buňky převést do suspenze. Byla provedena „pasáž“ (viz 3.2.4) a vzniklá buněčná suspenze byla centrifugačně promyta PBS od zbytků média (1000 RPM, 5 minut, centrifuga Hettich Universal 320R). Supernatant byl šetrně, ale důkladně odebrán a peleta resuspendována ve 250 μ l Diluentu C. Použité množství závisí na množství barvených buněk. Současně bylo připraveno 250 μ l roztoku barviva o koncentraci 8 μ M, který byl přidán k suspenzi buněk, směs důkladně promíchána a ponechána inkubovat 5 minut bez přístupu světla při laboratorní teplotě.

Inkubace byla zastavena přidáním 1 ml FBS, směs promíchána a centrifugována (1000 RPM, 10 minut, centrifuga Hettich Universal 320R). Získaná peleta byla resuspendována v 5 ml kompletního média LHC-9 s Geneticinem. Buňky byly poté ještě dvakrát centrifugačně promyty kompletním médiem (1000 RPM, 5 minut, centrifuga Hettich Universal 320R). Základní suspenze pro další práci byla získána resuspendováním výsledné pelety v kompletním médiu. Z této suspenze byl odebrán alikvot k určení počtu buněk.

Výsledná fluorescence byla měřena na spektrofluorimetru Tecan Infinite M200 Pro při vlnových délkách Ex/Em: 470/505 nm, čtení destičky zespoďu, vícenásobné čtení jamky: vyplněný kruh 4x4, gain nastaven automaticky. Fluorescence byla dále hodnocena na mikroskopu Nikon Eclipse, filtr 31001 RdiI C87701.

3.5 Adhezní test

Byla studována schopnost protilátek produkovaných ve slepicích proti bakteriálnímu lektinu PA-IIL snížit adhezi bakterií *Pseudomonas aeruginosa* na buňky plicního epitelu. Jako *ex vivo* modelový systém plicní tkáně byly zvoleny buněčné linie NuLi-1 a CuFi-1 pocházející od zdravého jedince, resp. pacienta s CF. Plicní i bakteriální buňky byly pro experiment značeny fluorescenčními barvivami, aby je bylo možné kvantifikovat (viz 3.4). Pro plicní buňky bylo použito barvivo PKH67, pro bakteriální buňky PKH26. Byly vyhodnocovány vzájemné poměry fluorescence bakteriálních buněk ku fluorescenci plicních buněk v přítomnosti a nepřítomnosti protilátek, případně dalších agens.

Plicní buňky byly barveny (viz 3.4.2) a z výsledné suspenze byl odebrán alikvot k počítání buněk (viz 3.2.5). Buňky byly nasazeny na 24 jamkovou destičku Corning Cell Bind v množství $5,5 \cdot 10^5$ buněk/jamka a převrstveny 750 μ l kompletního média. Inkubace probíhala přes noc v inkubátoru (37°C, 5% CO₂) do dosažení konfluentní monovrstvy.

Rozmražené bakteriální buňky *Pseudomonas aeruginosa* byly nasazeny do příslušného růstového média a ponechány růst přes noc při 37°C za konstantního třepání.

Byly použity dva druhy protilátek – specifická a kontrolní. Kontrolní protilátka pochází od zvířete ještě před imunizací daným antigenem, specifická protilátka pochází od zvířete imunizovaného rekombinantním lektinem PA-IIL. K dlouhodobé konzervaci roztoku protilátek byl použit azid sodný. Ten je však pro buňky toxický, proto byl roztok protilátek před experimentem dialyzován minimálně 24 hodin proti PBS (2-3 l PBS, po 12 hodinách výměna), aby se koncentrace azidu minimalizovala. Koncentrace protilátek byla měřena fotometricky při 280 nm a následně vypočtena dle vztahu:

- $\text{koncentrace protilátky} = A_{280} \cdot \text{ředění} \cdot 1,094$

Bakteriální buňky byly následující den centrifugačně promyty od média a značeny pomocí PKH26. Poté byla určena koncentrace měřením optické denzity při 600 nm na spektrofotometru Helios α . Na adhezní test bylo použito $5,5 \cdot 10^7$ bakteriálních buněk na jamku (100x více než bylo nasazeno plicních buněk). Následně byly připraveny suspenze bakterií s protilátkou v koncentraci 0,5 – 4 mg/ml.

Narostlé plicní buňky byly opláchnuty pomocí PBS od zbytků média. Následně na ně byla nanášena suspenze bakteriálních buněk v množství 300 μ l/jamka. Destička byla inkubována 2 hodiny bez přístupu světla za laboratorní teploty. Poté byly jednotlivé jamky měřeny na spektrofotometru Tecan Infinite M200 Pro v programu i-Control: spodní čtení destičky, vícenásobné čtení jamky: vyplněný kruh 4x4, gain 140 – 160 (PKH26)/ nastavený automaticky (PKH67), vlnové délky Ex/Em: 522/569 nm (PKH26); 470 /505 nm (PKH67). Následně byla z jamek odebrána suspenze bakterií a jamky byly 3x důkladně promyty PBS (1. promytí 500 μ l, 2. a 3. promytí 350 μ l). Buňky byly převrstveny 100 μ l PBS a změřeny na spektrofotometru při totožném nastavení.

Jednotlivé situace v jamkách za přítomnosti či nepřítomnosti protilátek byly následně hodnoceny vizuálně na mikroskopu Nikon Eclipse.

V případě zkoumání vlivu volného lektinu PA-IIL byl připraven roztok lektinu v destilované vodě s 0,9mM CaCl_2 . Tento zásobní roztok byl poté ředěn PBS na požadované koncentrace. Množství lektinu na jamku bylo následující: 250 ng; 50 ng; 10 ng; 2 ng; 0,4 ng a 0,08 ng. Jako kontrola byl použit roztok PBS. Plicní i bakteriální buňky byly barveny standardním postupem. Plicní buňky byly po promytí od média převrstveny 200 μ l roztoku lektinu v PBS a ponechány inkubovat 30 minut za laboratorní teploty. Poté byl roztok lektinu odebrán a do každé jamky přidáno 300 μ l roztoku bakterií PAK. Dále bylo postupováno dle obvyklého postupu (viz výše).

3.6 ELISA

ELISA (název odvozen z ang. názvu metody: Enzyme Linked Immunosorbent Assay) je imunochemická metoda založená na interakci antigenu s protilátkou, kterou lze kvantitativně změřit koncentraci protilátky nebo antigenu.

Antigen imobilizovaný v jamce mikrotitrační destičky je specificky rozpoznán primární protilátkou, na kterou se poté váže sekundární protilátka konjugovaná s enzymem katalyzujícím chromogenní reakci. Po přidání substrátu tohoto enzymu tedy vzniká barevný produkt, který lze spektrofotometricky detekovat a jehož absorbance odpovídá koncentraci primární protilátky.

Touto metodou bylo zjišťováno, zda námi používané protilátky proti bakteriálnímu lektinu *Pseudomonas aeruginosa* PA-IIL dlouhodobě skladované při 5°C jsou stále schopné tento lektin specificky rozpoznávat. Jako antigen imobilizovaný na destičce byl použit rekombinantně připravený lektin PA-IIL.

Použité roztoky:

- *PBS-ELISA*: 0,134 M NaCl; 1,8 mM Na₂HPO₄·12 H₂O; 1 mM NaH₂PO₄·2 H₂O; pH 7,2
- *imobilizační pufr*: 13 mM Na₂CO₃; 25 mM NaHCO₃; pH 9,6
- *PBS-ELISA + TWEEN*: 0,134 M NaCl; 1,8 mM Na₂HPO₄·12 H₂O; 1 mM NaH₂PO₄·2 H₂O; 0,1% (v/v) TWEEN 20®; pH 7,2
- *blokovací roztok*: 2% (w/v) řádký bílek v PBS-ELISA + TWEEN
- *vyvolávací roztok pro alkalickou fosfatasu*: 30 mM NaHCO₃; 20 mM Na₂CO₃; 1 mM MgCl₂; 0,1% p-nitrofenolfosfát
- *zastavovací roztok po AP*: 3 M NaOH

Byl připraven roztok lektinu PA-IIL o koncentraci 4 µg/ml v imobilizačním pufru a 100 µl bylo aplikováno do jamek destičky ELISA POLYSORB a ty ponechány inkubovat přes noc v 5°C. Po inkubaci byl roztok lektinu odstraněn a jamky propláchnuty 5x 200 µl PBS-ELISA + TWEEN.

Promyté jamky s imobilizovaným lektinem byly blokovány pomocí 150 µl 2% (w/v) roztoku řádkého bílku v PBS-ELISA + TWEEN po dobu 1 hodiny při 37°C. Jamky byly poté promyty 5x PBS-ELISA + TWEEN a aplikovány roztoky primární protilátky v PBS-ELISA o koncentraci: 90, 30, 10 a 3,3 µg/ml. Inkubace probíhala 2 hod při 37°C. Poté byly jamky znovu promyty 5x PBS-ELISA + TWEEN, přidána sekundární protilátka značená alkalickou fosfatasou ředěná 1:2000 v PBS-ELISA a inkubovány 1 hod při 37°C. Po inkubaci byly jamky opět promyty 5x PBS-ELISA+TWEEN.

Následovalo přidání 100 µl vyvolávacího roztoku, reakce ponechána 10 min probíhat a poté zastavena přidávkem 100 µl 3M roztoku NaOH. Absorbance byla měřena na přístroji Sunrise Remote při vlnové délce 405 nm.

3.7 Elektroforeza a „Western blot“

3.7.1 Příprava vzorků

K elektroforeze byly použity lyzáty buněk bakterií *Pseudomonas aeruginosa*. Narostlé bakterie byly 2x centrifugačně promyty pomocí PBS (12000 RPM, 5 minut, Eppendorf Centrifuge 5415R). Poté byla změřena absorbance při 600 nm jednotlivých bakteriálních preparátů a vzorky naředěny na stejnou hustotu suspenze bakterií do destilované vody. Jednotlivé vzorky byly sonikovány (Bandelin VW 3100, amplituda 45 %, 2 minuty). Po sonikaci byl ke vzorkům přidán 4x koncentrovaný redukující vzorkový pufr. Vzorky byly inkubovány 10 min při 100°C, po vychladnutí byly mikrozkušavky několik sekund centrifugovány pro odstředění zkondenzované vody na víčku zkumavky. Vzorky byly skladovány v mrazícím boxu a před elektroforetickou separací ještě jednou krátce povařeny (100°C, 5 minut).

3.7.2 SDS elektroforeza v polyakrylamidovém gelu

Elektroforeza v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsíranu sodného (ang. SDS-PAGE) je elektromigrační metoda používaná k separaci proteinů podle molekulové hmotnosti. Rychlost pohybu je závislá na intenzitě el. pole, náboji, velikosti a tvaru částice.

SDS je detergent nesoucí záporný náboj, který se váže na proteiny a denaturuje je. Všechny proteiny získají záporný náboj a v elektrickém poli se poté pohybují k anodě. Pohyblivost jednotlivých částic je úměrná jejich molekulové hmotnosti. V našem případě byl vzhledem k nízké molekulové hmotnosti detekovaného proteinu použit 15% separační a 5% zaostřovací gel.

Použité roztoky:

- *Pufr A*: 0,375 M Tris/HCl; 0,1% (w/v) SDS; pH 8,8
- *polymerační roztok A*: 30% (w/v) akrylamid; 0,8% (w/v) BIS v pufru A
- *pufr B*: 0,125 M Tris/HCl; 0,1% (w/v) SDS; pH 6,8
- *polymerační roztok B*: 30% (w/v) akrylamid; 0,8% (w/v) BIS v pufru B
- *4x koncentrovaný redukující vzorkový pufr*: 0,25 M Tris/HCl; 8% (w/v) SDS; 20% (v/v) 2-merkapt ethanol; 0,004% (w/v) bromfenolová modř; 40% (v/v) glycerol; pH 6,8

- *peroxosíran amonný (APS)*: 10% (w/v) peroxosíran amonný v destilované vodě
- *elektrodový pufr*: 0,192 M glycin; 0,025 M Tris/HCl; 0,1% (w/v) SDS; pH 8,3
- *barvicí lázeň*: 0,25% (w/v) Coomassie Brilliant Blue R-250; 46% (v/v) ethanol; 9,2% (v/v) kyselina octová
- *odbarvovací lázeň*: 25% (v/v) ethanol; 10% (v/v) kyselina octová; destilovaná voda

Skla byla odmaštěna ethanolem a sestavena (síla gelu 1 mm). Mezi skla byl nalit roztok pro 15% separační gel (3,5 ml pufr A; 3,5 ml polymerační roztok A; 7 μ l TEMED; 70 μ l APS), který byl převrstven destilovanou vodou a ponechán 30 minut polymerovat. Poté byl gel osušen, převrstven roztokem pro 5% zaostřovací gel (2,5 ml pufr B; 500 μ l polymerační roztok B; 3 μ l TEMED; 60 μ l APS), do kterého byl zasunut hřeben pro vytvoření jamek. Polymerace probíhala 20 minut. Následně byl hřeben opatrně vyjmut a skla byla umístěna do aparatury. Do elektrodového prostoru byl nalit elektrodový pufr.

Do jamek byly nanášeny vzorky (lyzáty bakteriálních buněk) v množství 20 μ l, standard lektinu PA-IIL v množství 15 μ l (2 μ g proteinu) a „Marker“ molekulových hmotností v množství 10 μ l. Byl použitý „Marker“ BioRad Precision Plus Protein™ Dual Color Standard. Aparatura byla vložena do elektroforetické vany naplněné elektrodovým pufrem.

Při napětí 70 V elektroforesa probíhala zhruba 30 minut, po průchodu vzorků do separačního gelu bylo napětí zvýšeno na 150 V a elektroforesa probíhala ještě 90 minut, dokud čelo nedoputovalo cca 0,5 cm od konce gelu. Poté byla aparatura rozebrána a separační gel barven v barvicí lázni nebo byl dále použit pro elektropřenos proteinů na membránu („Western blot“).

Vždy byly připraveny dva totožné gely, z nichž jeden byl po proběhnutí elektroforesy barven. Z druhého gelu byly proteiny pomocí elektropřenosu přeneseny na PVDF membránu a gel poté barven pro zhodnocení účinnosti přenosu. Barvení probíhalo přes noc, druhý den byl gel umístěn do odbarvovacího roztoku na „třepačku“, který byl průběžně měněn, dokud nebyl gel odbarven.

3.7.3 „Western blot“

Western blot je metoda k přenosu proteinů na membránu působením elektrického proudu a následné imunodetekci pomocí protilátek. Směs proteinů je nejdříve pomocí SDS elektroforezy v polyakrylamidovém gelu rozdělena podle velikosti a proteiny z gelu jsou poté přeneseny na PVDF nebo nitrocelulosovou membránu. Membrána s proteiny je poté pomocí primární a následně sekundární protilátky imunochemicky vyhodnocena.

Použité chemikálie:

- *Přenosový pufr*: 0,025 M Tris; 0,192 M glycin; pH 8,3
- *PBS Triton X-100*: 0,134 M NaCl; 1,8 mM Na₂HPO₄·12 H₂O; 1 mM NaH₂PO₄·2 H₂O; 0,3% (v/v) Triton X-100; pH 7,2
- *blokovací roztok*: 5% (w/v) roztok odtučněného mléka v PBS Triton X-100
- *barvicí roztok Ponceau Red*: 0,2% (w/v) Ponceau Red; 10% CH₃COOH v destilované vodě

Separční gel po elektroforese byl umístěn do přenosového pufru a ponechán za mírného třepání 30 minut inkubovat, po 15 minutách byl pufr vyměněn za čerstvý. Mezitím byly podle velikosti gelu nastříhány filtrační papíry Whatman 3 a PVDF membrána. Membrána byla krátce smočena v methanolu, destilované vodě a poté v přenosovém pufru.

Do přístroje na blot byly umístěny tři filtrační papíry nasáklé přenosovým pufrem, na ně byla umístěna membrána, na membránu byl položen gel a na něj další tři filtrační papíry nasáklé přenosovým pufrem. Ze „sendviče“ byly pomocí válečku odstraněny vzduchové bubliny a přebytečný pufr a aparatura pevně uzavřena víkem přístroje. Přenos probíhal 45 minut při proudové hustotě 2 mA/cm² membrány. Po ukončení přenosu byl gel umístěn do barvicí lázně a membrána barvena roztokem Ponceau red pro kontrolu úspěšnosti přenosu. Membrána byla poté promyta destilovanou vodou od barviva a umístěna přes noc v chladu v blokovacím roztoku.

Druhý den byla membrána inkubována 2 hodiny v 10 ml roztoku primární slepičí protilátky proti lektinu PA-IIL o koncentraci 30 µl/ml v blokovacím roztoku. Poté byla membrána promyta 3x blokovacím roztokem, vždy 2 minuty na třepačce. Následovala inkubace 1 hodinu v 10 ml blokovacího roztoku se 7 µl sekundární protilátky

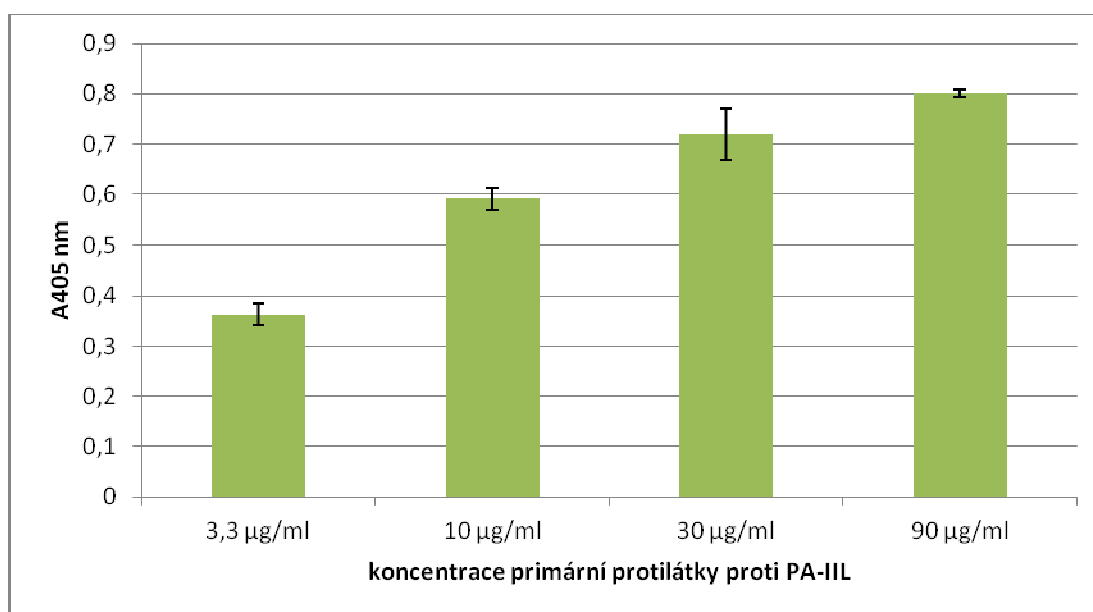
(Anti-Chicken IgY (IgG) (whole molecule) – Alkaline Phosphatase, antibody produced in rabbit, Sigma). Membrána byla poté promyta 3x blokovacím roztokem a 3x roztokem PBS Triton X-100.

Dle návodu od výrobce byl připraven vyvolávací roztok (AP Conjugate Substrate Kit, BioRad) a nalit na membránu. Po vyvolání byla membrána propláchnuta destilovanou vodou a usušena.

4 Výsledky

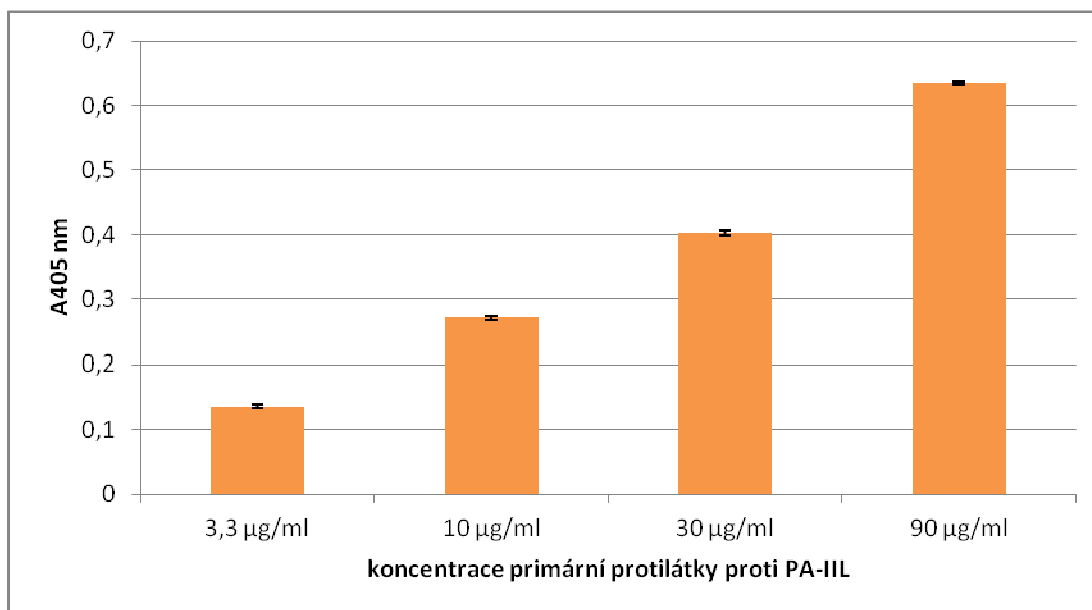
4.1 ELISA

Pro ověření schopnosti používané protilátky rozpoznat specificky lektin PA-IIL byla použita metoda ELISA. Jako antigen byl použitý rekombinantně připravený povrchový lektin *Pseudomonas aeruginosa* PA-IIL, proti kterému byla tato protilátka připravena, a také lektin PA-IILΔG, který je zkrácený o glycin na C-konci. K detekci byla použita sekundární protilátka proti slepičí protilátce značená alkalickou fosfatou. Od naměřených hodnot byl odečten blank (jamky bez přidané primární protilátky) a od hodnot pro specifickou protilátku byly následně odečteny hodnoty naměřené pro kontrolní protilátku, aby došlo k odečtení příspěvku možných nespecifických interakcí. Výsledky pro použitý antigen PA-IIL jsou uvedeny na obrázku 7 a pro PA-IILΔG použitý jako antigen na obrázku 8, na straně 40.



Obr. 7 – Určení imunoreaktivity specifické protilátky vůči lektinu PA-IIL

Závislost naměřených hodnot na použité koncentraci primární protilátky získaná metodou ELISA. Jako antigen byl použit rekombinantně připravený lektin PA-IIL v koncentraci 4 µg/jamka. Hodnoty jsou uvedené po odečtení absorbance pozadí (0,1300) a stejně naředěné kontrolní protilátky.

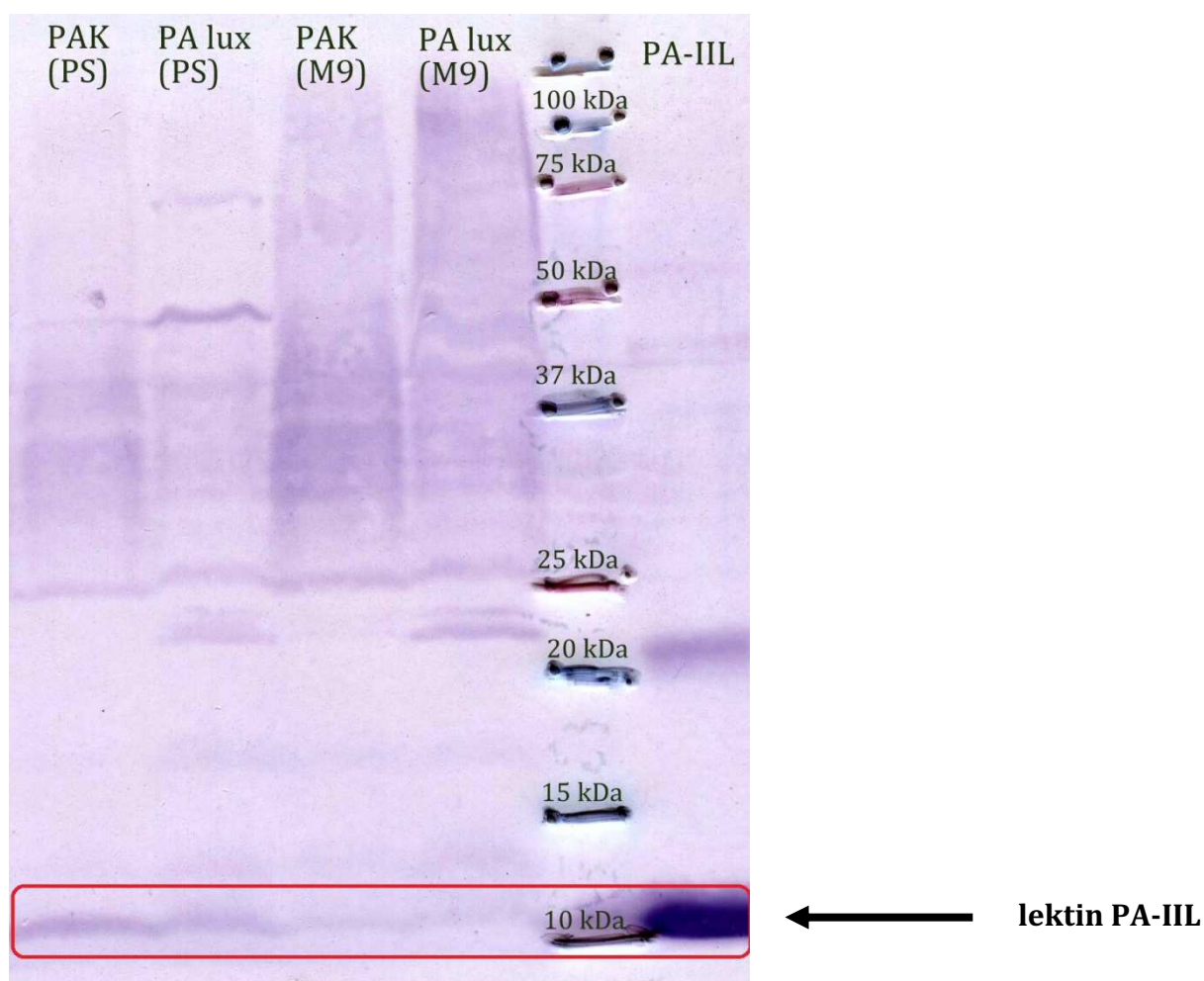


Obr. 8 – Určení imunoreaktivity specifické protilátky vůči lektinu PA-IILΔG

Závislost naměřených hodnot na použité koncentraci primární protilátky získaná metodou ELISA. Jako antigen byl použit rekombinantně připravený lektin PA-IILΔG v koncentraci 4 µg/jamka. Hodnoty jsou uvedené po odečtení absorbance pozadí (0,1200) a stejně naředěné kontrolní protilátky.

4.2 Elektroforeza a „Western blot“ lektinu PA-IIL

Bylo třeba ověřit, zda používané bakterie produkují lektin PA-IIL a zda je tento lektin detekovatelný specifickou slepičí protilátkou. Jako vzorky byly použity lyzáty bakteriálních buněk pěstovány v plném a minimálním růstovém médiu pro porovnání množství produkovaného lektinu. Byl použitý 15% separační a 5% zaostřovací polyakrylamidový gel (viz 3.7.1). Proteiny z gelu po elektroforese byly přeneseny technikou „Western blotu“ na PVDF membránu a detekovány pomocí protilátek (viz 3.7.2). Membrána po vyvolání je na obrázku 9.



Obr. 9 - Imunodetekce lektinu v lyzátu bakterií

PAK – kontrolní kmen PA, PA lux – luminiscenční kmen PA, PS – plné růstové médium,
M9 – minimální růstové médium; jako standard byl použit rekombinantně připravený lektin PA-IIL

4.3 Adhezní testy

Slepičí protilátky by mohly být vhodné jako profylaxe bakteriálních infekcí u pacientů s CF, proto bylo cílem práce porovnat vliv těchto imunoglobulinů na adhezi různých bakteriálních kmenů *Pseudomonas aeruginosa* na buňky plicního epitelu. Dále byl hodnocen vliv koncentrace protilátky na adhezi. Také byly porovnávány kontrolní protilátky od různých slepic a jejich vliv na výsledek testu.

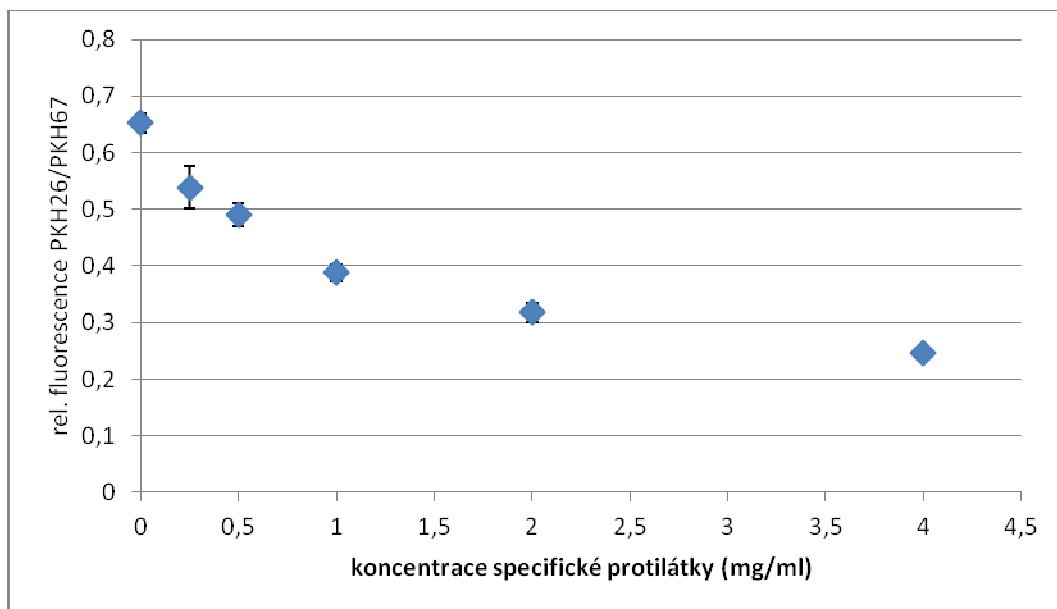
Byly použity slepičí protilátky proti bakteriálnímu lektinu PA-IIL. Kontrolní protilátka byla izolována z vajec před imunizací slepice a specifická protilátka pocházela ze slepice po imunizaci daným lektinem.

Pro kvantifikaci a vizualizaci plicních a bakteriálních buněk bylo použito barvení fluorescenčními barvivy PKH. Výsledky byly vyhodnocovány jako vzájemné poměry relativních fluorescencí obou typů buněk.

Plicní buňky (NuLi-1 a CuFi-1) byly fluorescenčně značeny barvivem PKH67 a poté nasazeny na destičku v množství $5,5 \cdot 10^5$ buněk/jamka. Do jamek byla přidána suspenze bakterií v přítomnosti, resp. nepřítomnosti protilátky. Po 2h inkubaci byla destička spektrofluorimetry vyhodnocena.

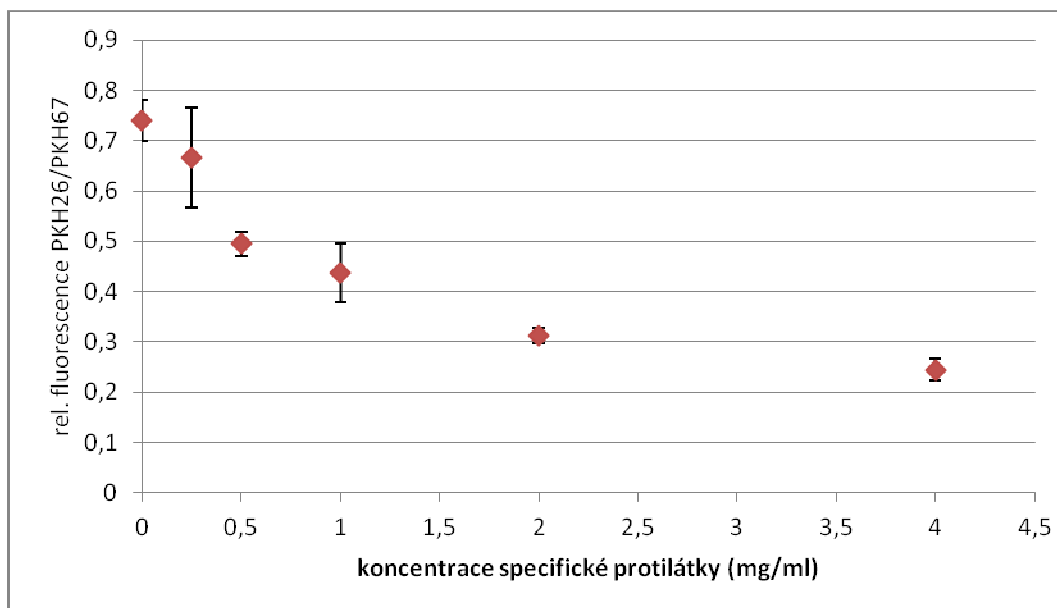
4.3.1 Optimalizace množství protilátky

Na bakteriálním kmenu PAK byl porovnáván vliv vzrůstající koncentrace specifické protilátky. Byly použity roztoky bakterií o koncentraci protilátky 0 – 4 mg/ml. Výsledné hodnoty pro CuFi-1 jsou na obrázku 10 a pro NuLi-1 na obrázku 11 na straně 44.



Obr. 10 - Relativní adherence bakterií PAK na buňky CuFi-1 v závislosti na koncentraci specifické protilátky

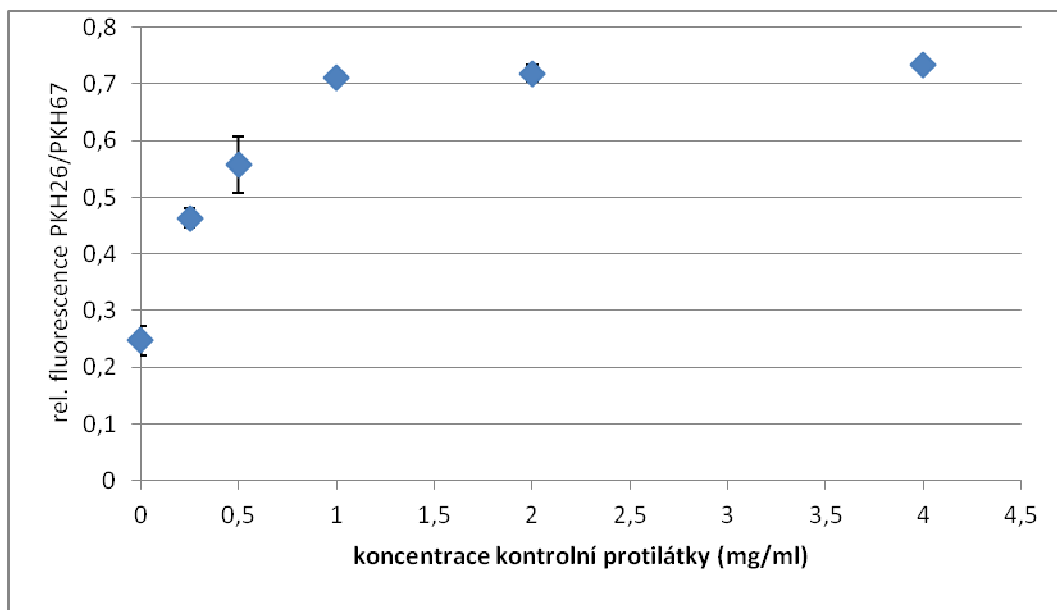
Byl použit kontrolní kmen bakterií (PAK). Do grafu byly vyneseny poměry relativní fluorescence bakterií (PKH26: Ex/Em – 522/569 nm) a buněk CuFi-1 (PKH67: Ex/Em – 470/505 nm) určené pro jednotlivé koncentrace specifické protilátky. Graf reprezentuje situaci po odmytí neadherovaných bakterií. Hodnoty relativní fluorescence použité pro určení poměru jsou po odečtu pozadí (buňky: 5126, bakterie: 3546). Jsou vyneseny průměrné hodnoty vždy ze 3 jamek včetně směrodatné odchylky.



Obr. 11 - Relativní adherence bakterií PAK na buňky NuLi-1 v závislosti na koncentraci specifické protilátky

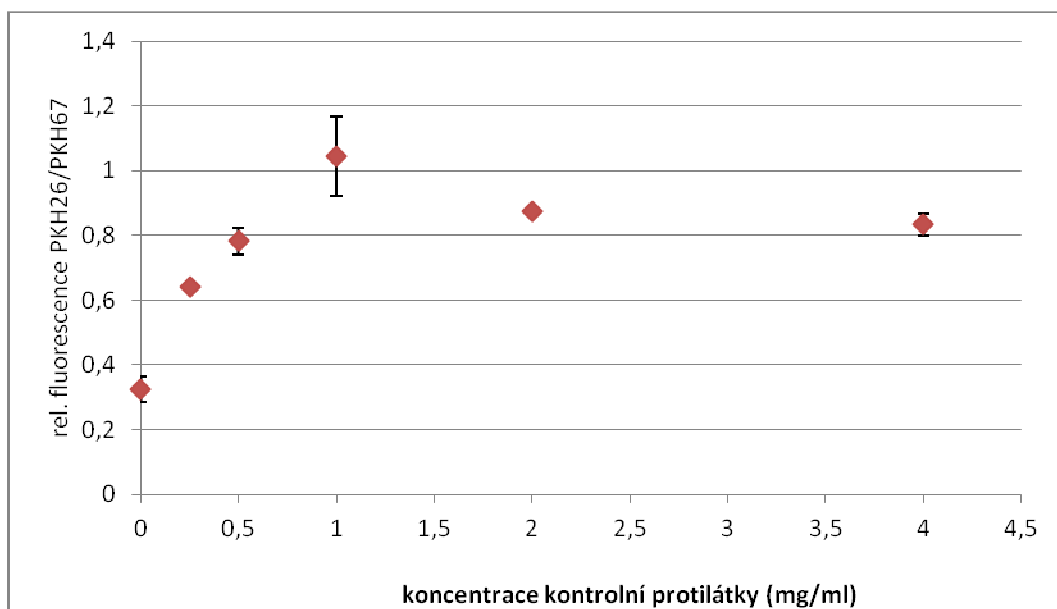
Byl použit kontrolní kmen bakterií (PAK). Do grafu byly vyneseny poměry relativní fluorescence bakterií (PKH26: Ex/Em – 522/569 nm) a buněk NuLi-1 (PKH67: Ex/Em – 470/505 nm) určené pro jednotlivé koncentrace specifické protilátky. Graf reprezentuje situaci po odmytí neadherovaných bakterií. Hodnoty relativní fluorescence použité pro určení poměru jsou po odečtu pozadí (buňky: 13771, bakterie: 3622). Jsou vyneseny průměrné hodnoty vždy ze 3 jamek včetně směrodatné odchylky.

Vliv koncentrace kontrolní protilátky na adhezi bakterií byl porovnáván také pro kontrolní protilátku. Použité roztoky bakterií byly o koncentraci protilátky 0 – 4 mg/ml. Výsledné hodnoty pro CuFi-1 jsou na obrázku 12 a pro NuLi-1 na obrázku 13 na straně 45.



Obr. 12 - Relativní adherence bakterií PAK na buňky CuFi-1 v závislosti na koncentraci kontrolní protilátky

Byl použit kontrolní kmen bakterií (PAK). Do grafu byly vyneseny poměry relativní fluorescence bakterií (PKH26: Ex/Em – 522/569 nm) a buněk CuFi-1 (PKH67: Ex/Em – 470/505 nm) určené pro jednotlivé koncentrace kontrolní protilátky. Graf reprezentuje situaci po odmytí neadherovaných bakterií. Hodnoty relativní fluorescence použité pro určení poměru jsou po odečtu pozadí (buňky: 4388, bakterie: 2198). Jsou vyneseny průměrné hodnoty vždy ze 3 jamek včetně směrodatné odchylky.

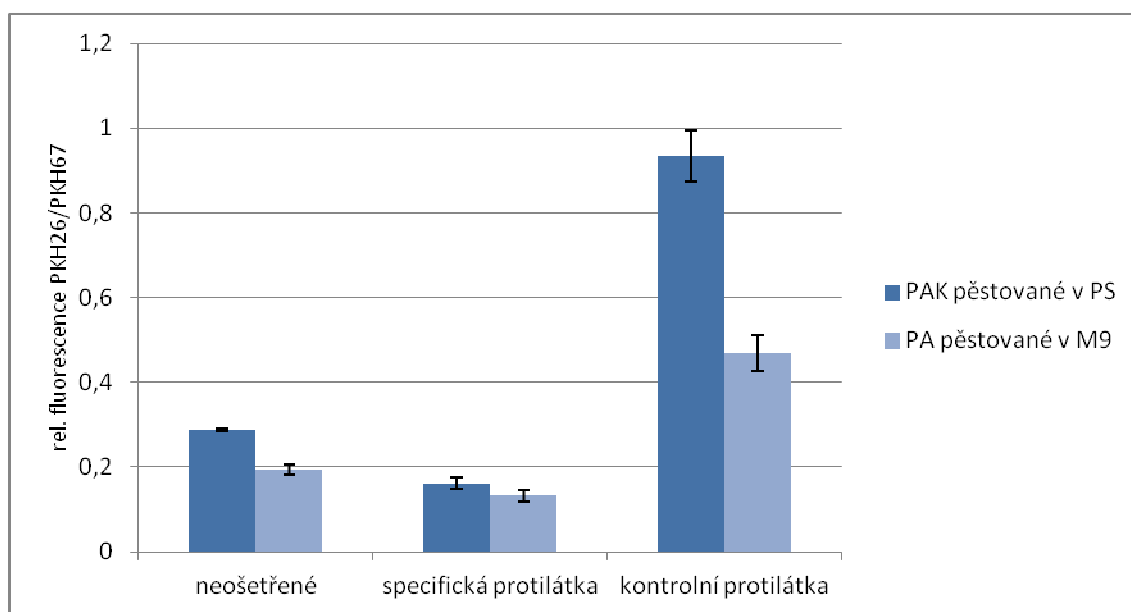


Obr. 13 - Relativní adherence bakterií PAK na buňky NuLi-1 v závislosti na koncentraci kontrolní protilátky

Byl použit kontrolní kmen bakterií (PAK). Do grafu byly vyneseny poměry relativní fluorescence bakterií (PKH26: Ex/Em – 522/569 nm) a buněk NuLi-1 (PKH67: Ex/Em – 470/505 nm) určené pro jednotlivé koncentrace kontrolní protilátky. Graf reprezentuje situaci po odmytí neadherovaných bakterií. Hodnoty relativní fluorescence použité pro určení poměru jsou po odečtu pozadí (buňky: 7248, bakterie: 2096). Jsou vyneseny průměrné hodnoty vždy ze 3 jamek včetně směrodatné odchylky.

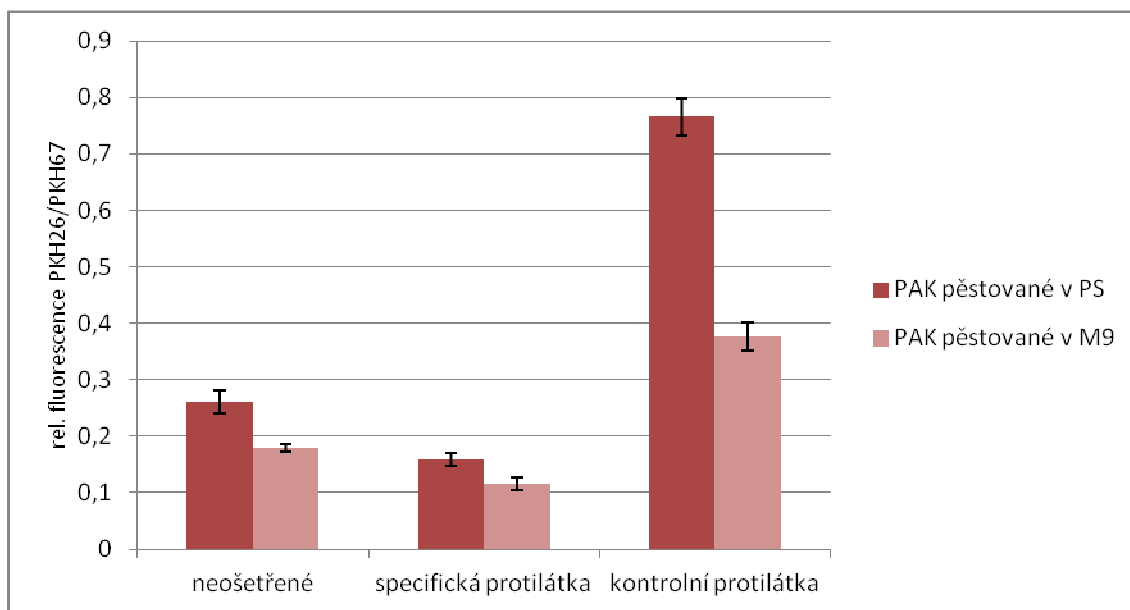
4.3.2 Porovnání adherence bakterií pěstovaných v rozdílných médiích

Byl zjišťován vliv růstového média použitého pro napěstování bakterií na jejich schopnost adheze na plicní buňky. Buňky byly pěstovány v minimálním (M9) a plném (PS) médiu, složení je uvedeno v kap. 3.3. Výsledky jsou uvedeny v grafu na obrázku 14 pro CuFi-1 a na obrázku 15 na straně 47 pro NuLi-1.



Obr. 14 - Relativní adherence bakterií PAK na buňky CuFi-1

Byl použit kontrolní kmen bakterií (PAK). Do grafu byly vyneseny poměry relativní fluorescence bakterií (PKH26: Ex/Em – 522/569 nm) a buněk CuFi-1 (PKH67: Ex/Em – 470/505 nm) určené pro jednotlivé směsi. Graf reprezentuje situaci po odmytí neadherovaných bakterií. Hodnoty relativní fluorescence použité pro určení poměru jsou po odečtu pozadí (buňky: 2911, bakterie: 2176). Jsou vyneseny průměrné hodnoty vždy ze 3 jamek včetně směrodatné odchylky.



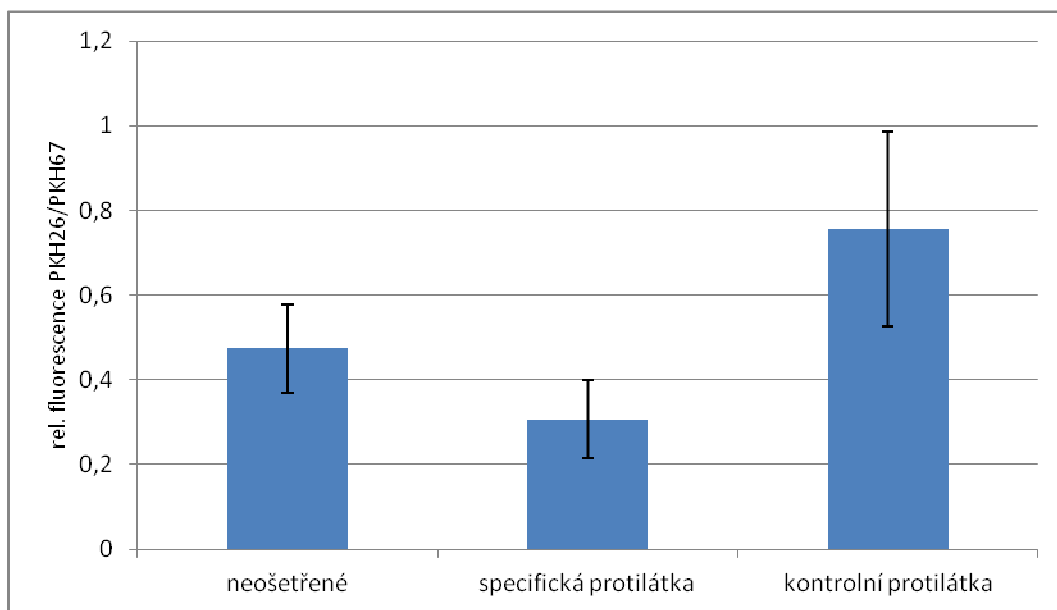
Obr. 15 - Relativní adherence bakterií PAK na buňky NuLi-1

Byl použit kontrolní kmen bakterií (PAK). Do grafu byly vyneseny poměry relativní fluorescence bakterií (PKH26: Ex/Em – 522/569 nm) a buněk NuLi-1 (PKH67: Ex/Em – 470/505 nm) určené pro jednotlivé směsi. Graf reprezentuje situaci po odmytí neadherovaných bakterií. Hodnoty relativní fluorescence použité pro určení poměru jsou po odečtu pozadí (buňky: 3296, bakterie: 2090). Jsou vyneseny průměrné hodnoty vždy ze 3 jamek včetně směrodatné odchylky.

4.3.3 Hodnocení vlivu fluorescenčního barvení na adherenci bakterií

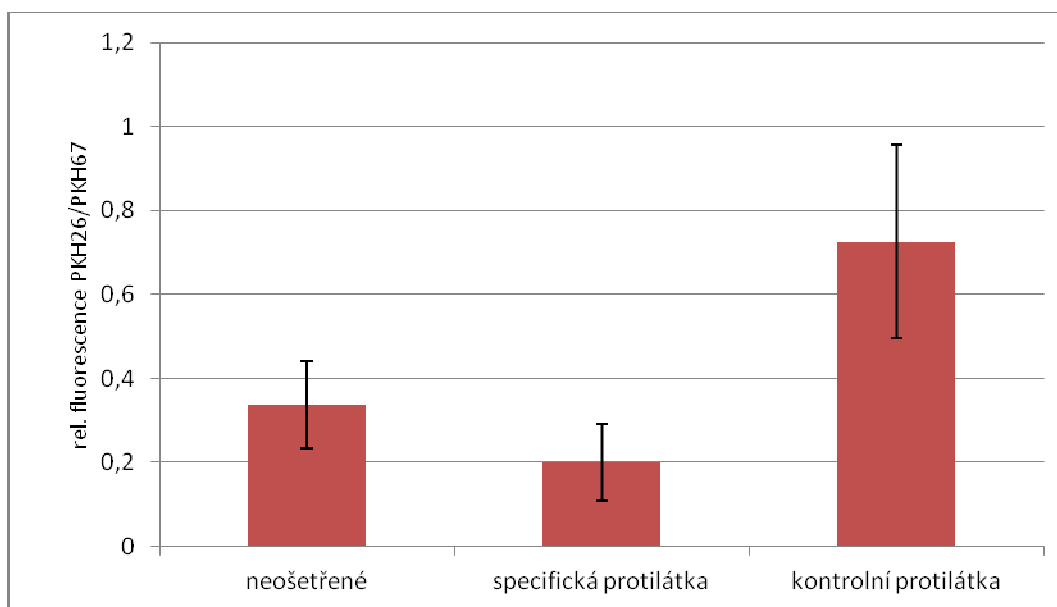
Bylo hodnoceno, zda proces fluorescenčního barvení bakterií pomocí PKH26 má vliv na jejich schopnost adherence na buňky plicního epitelu. K tomuto účelu byl použit luminiscenční kmen *Pseudomonas aeruginosa* (PA lux). Bakteriální buňky byly použity jak barvené, tak nebarvené – vykazující pouze luminiscenci. U barvených bakteriálních buněk byla měřena jak fluorescence (PKH26), tak luminiscence, u nebarvených byla měřena pouze luminiscence. Protilátky byly použity v koncentraci 1 mg/ml.

Graf poměru relativní fluorescence bakterií barvených PKH26 a relativní fluorescence eukaryotických buněk je na straně 48, na obrázku 16 na straně pro CuFi-1 a na obrázku 17 pro NuLi-1. Graf poměru relativní luminiscence bakterií barvených PKH26 a relativní fluorescence eukaryotických buněk je na straně 49, na obrázku 18 pro CuFi-1 a obrázku 19 pro NuLi-1. Poměr relativní luminiscence nebarvených bakterií a relativní fluorescence eukaryotických buněk je na straně 50, na obrázku 20 pro CuFi-1 a na obrázku 21 pro NuLi-1.



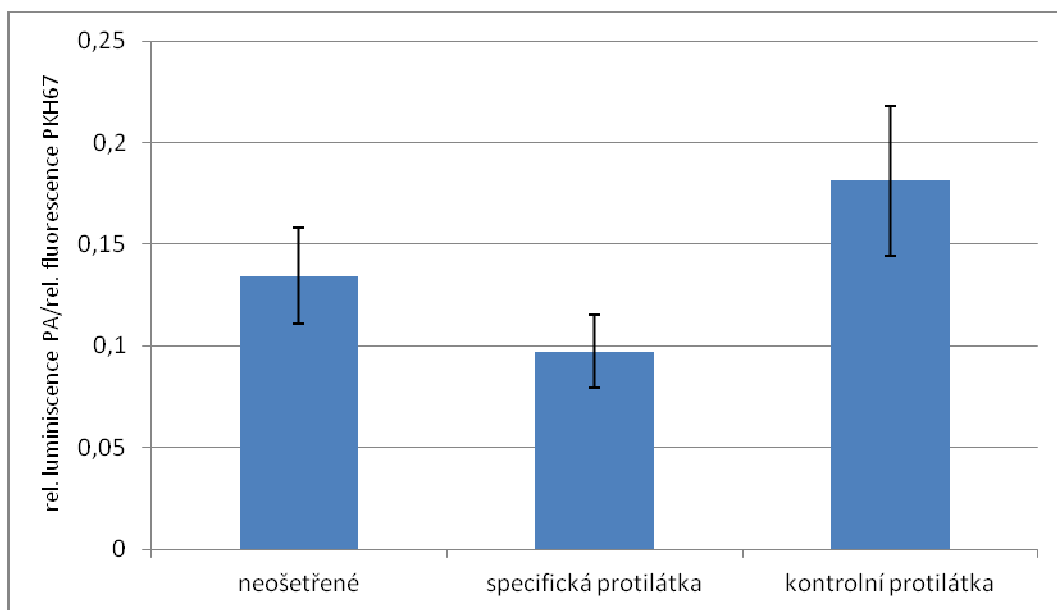
Obr. 16 - Relativní adherence bakterií PA lux na buňky CuFi-1

Byl použit luminiscenční kmen bakterií (PA lux). Do grafu byly vyneseny poměry relativní fluorescence bakterií (PKH26: Ex/Em – 522/569 nm) a buněk CuFi-1 (PKH67: Ex/Em – 470/505 nm) určené pro jednotlivé směsi. Graf reprezentuje situaci po odmytí neadherovaných bakterií. Hodnoty relativní fluorescence použité pro určení poměru jsou po odečtu pozadí (buňky: 4265, bakterie: 1399). Jsou vyneseny průměrné hodnoty vždy ze 3 jamek včetně směrodatné odchylky.



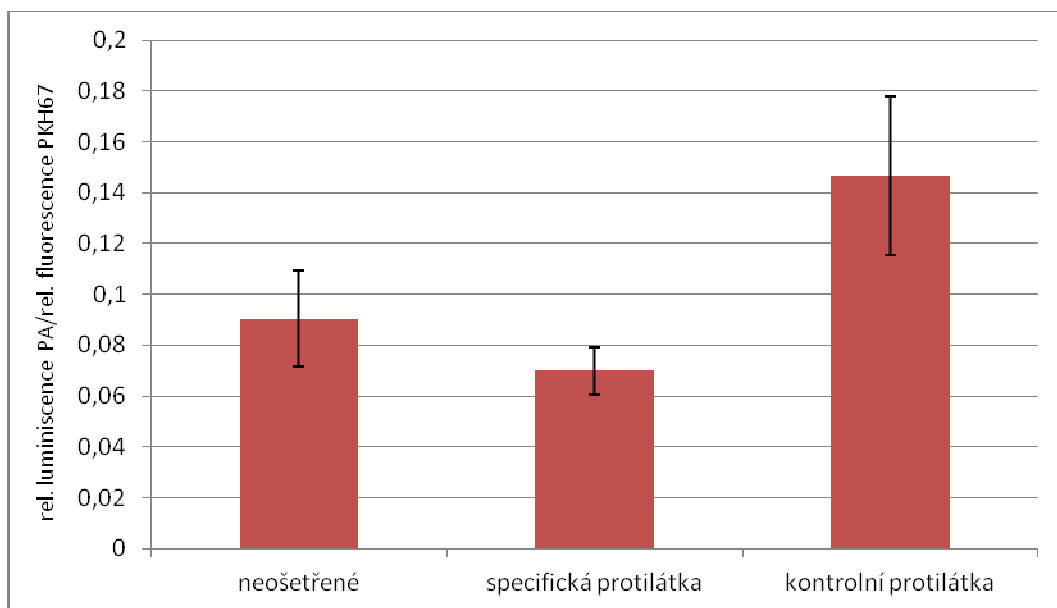
Obr. 17 - Relativní adherence bakterií PA lux na buňky NuLi-1

Byl použit luminiscenční kmen bakterií (PA lux). Do grafu byly vyneseny poměry relativní fluorescence bakterií (PKH26: Ex/Em – 522/569 nm) a buněk NuLi-1 (PKH67: Ex/Em – 470/505 nm) určené pro jednotlivé směsi. Graf reprezentuje situaci po odmytí neadherovaných bakterií. Hodnoty relativní fluorescence použité pro určení poměru jsou po odečtu pozadí (buňky: 4759, bakterie: 1276). Jsou vyneseny průměrné hodnoty vždy ze 3 jamek včetně směrodatné odchylky.



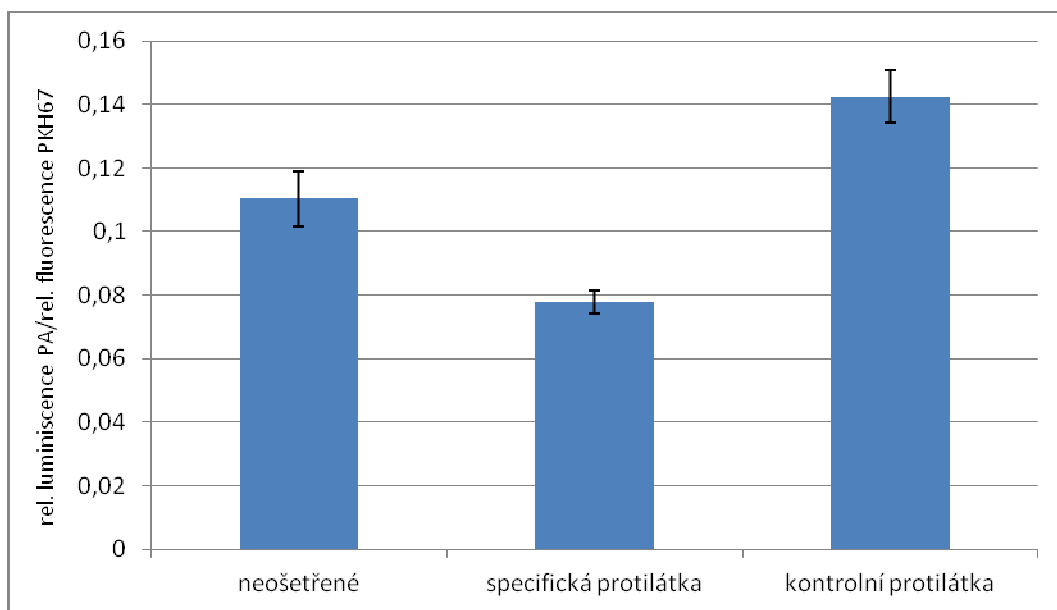
Obr. 18 - Relativní adherence bakterií PA lux na buňky CuFi-1

Byl použit luminiscenční kmen bakterií (PA lux) barvený pomocí PKH26. Do grafu byly vyneseny poměry relativní luminiscence bakterií (luminiscence PA: bez zeslabení, integrační čas 1000 ms) a relativní fluorescence buněk CuFi-1 (PKH67: Ex/Em – 470/505 nm) určené pro jednotlivé směsi. Graf reprezentuje situaci po odmytí neadherovaných bakterií. Hodnoty relativní fluorescence použité pro určení poměru jsou po odečtu pozadí (buňky: 4265, bakterie: 12). Jsou vyneseny průměrné hodnoty vždy ze 3 jamek včetně směrodatné odchylky.



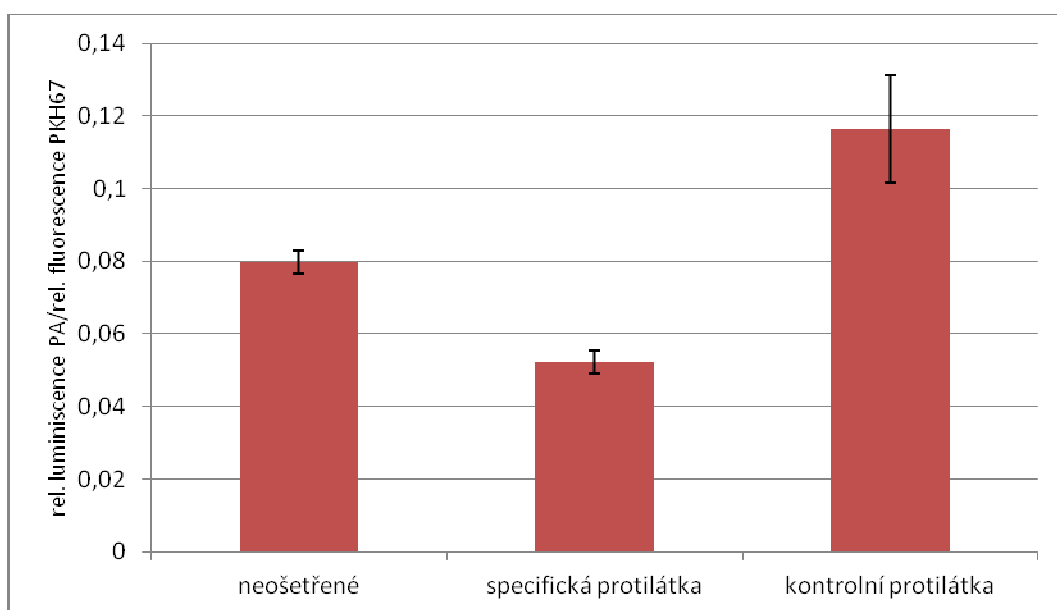
Obr. 19 - Relativní adherence bakterií PA lux na buňky NuLi-1

Byl použit luminiscenční kmen bakterií (PA lux) barvený pomocí PKH26. Do grafu byly vyneseny poměry relativní luminiscence bakterií (luminiscence PA: bez zeslabení, integrační čas 1000 ms) a relativní fluorescence buněk NuLi-1 (PKH67: Ex/Em – 470/505 nm) určené pro jednotlivé směsi. Graf reprezentuje situaci po odmytí neadherovaných bakterií. Hodnoty relativní fluorescence použité pro určení poměru jsou po odečtu pozadí (buňky: 5237, bakterie: 16). Jsou vyneseny průměrné hodnoty vždy ze 3 jamek včetně směrodatné odchylky.



Obr. 20 - Relativní adherence bakterií PA lux na buňky CuFi-1

Byl použit nebarvený luminiscenční kmen bakterií (PA lux). Do grafu byly vyneseny poměry relativní luminiscence bakterií (luminiscence PA: bez zeslabení, integrační čas 1000 ms) a relativní fluorescence buněk CuFi-1 (PKH67: Ex/Em – 470/505 nm) určené pro jednotlivé směsi. Graf reprezentuje situaci po odmytí neadherovaných bakterií. Hodnoty relativní fluorescence použité pro určení poměru jsou po odečtu pozadí (buňky: 4265, bakterie: 12). Jsou vyneseny průměrné hodnoty vždy ze 3 jamek včetně směrodatné odchylky.



Obr. 21 - Relativní adherence bakterií PA lux na buňky NuLi-1

Byl použit nebarvený luminiscenční kmen bakterií (PA lux). Do grafu byly vyneseny poměry relativní luminiscence bakterií (luminiscence PA: bez zeslabení, integrační čas 1000 ms) a relativní fluorescence buněk NuLi-1 (PKH67: Ex/Em – 470/505 nm) určené pro jednotlivé směsi. Graf reprezentuje situaci po odmytí neadherovaných bakterií. Hodnoty relativní fluorescence použité pro určení poměru jsou po odečtu pozadí (buňky: 5237, bakterie: 16). Jsou vyneseny průměrné hodnoty vždy ze 3 jamek včetně směrodatné odchylky.

4.3.4 Porovnání adheze různých bakteriálních kmenů PA

Byla porovnána adheze několika bakteriálních kmenů *Pseudomonas aeruginosa* na buňky plicního epitelu v přítomnosti specifické a kontrolní protilátky.

Všechny použité bakteriální kmeny *Pseudomonas aeruginosa* byly pěstovány v plném médiu. Použitá koncentrace specifické i kontrolní protilátky byla 1 mg/ml.

Výsledky pro PAK (ST 1763) jsou uvedeny na straně 52, pro CuFi-1 na obrázku 22 a pro NuLi-1 na obrázku 23.

Výsledky pro PA01 jsou uvedeny na straně 53, pro CuFi-1 na obrázku 24 a pro NuLi-1 na obrázku 25.

Kmeny izolované z pacientů trpících cystickou fibrosou

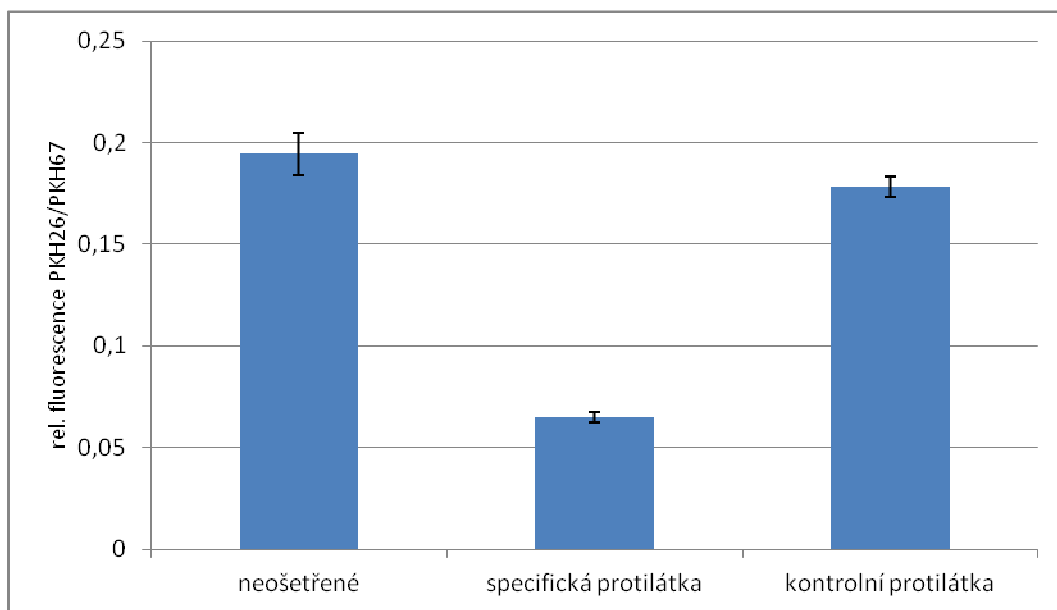
Byly použity 4 kmeny *Pseudomonas aeruginosa* izolované z pacientů s CF – PA 966 (ST 966), PA 1003 (ST 1003), PA 1022 (ST 1022) a zatím nezařazený kmen PA CF.

Výsledky pro PA 966 jsou uvedeny na straně 54, pro buňky CuFi-1 jsou uvedeny na obrázku 26 a pro buňky NuLi-1 na obrázku 27.

Výsledky pro PA 1003 jsou uvedeny na straně 55, pro buňky CuFi-1 jsou uvedeny na obrázku 28 a pro buňky NuLi-1 na obrázku 29.

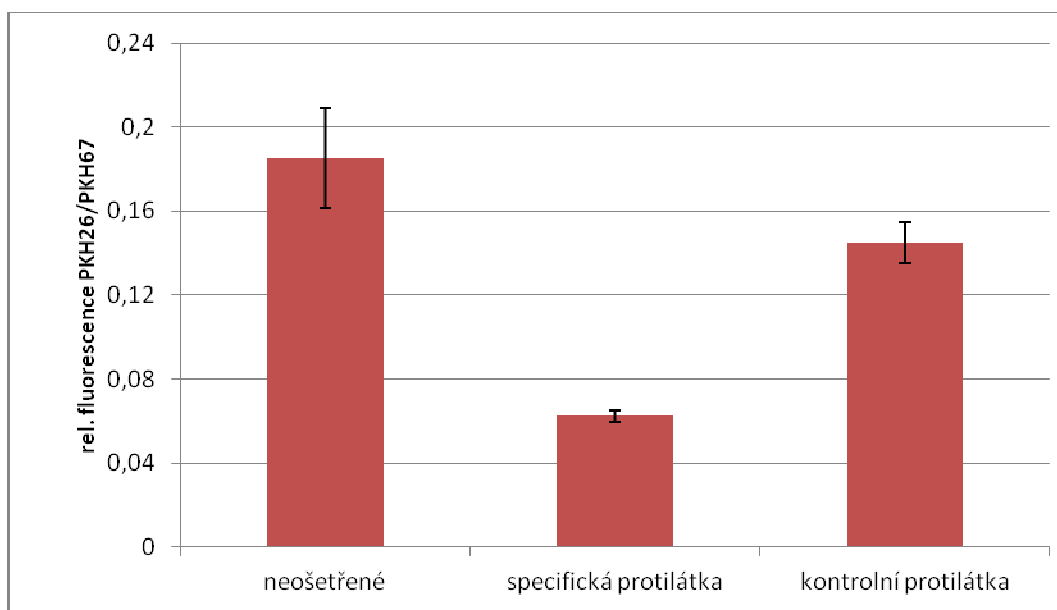
Výsledky pro PA 1022 jsou uvedeny na straně 56, pro buňky CuFi-1 jsou uvedeny na obrázku 30 a pro buňky NuLi-1 na obrázku 31.

Výsledky pro PA CF jsou uvedeny na straně 57, pro buňky CuFi-1 jsou uvedeny na obrázku 32 a pro buňky NuLi-1 na obrázku 33.



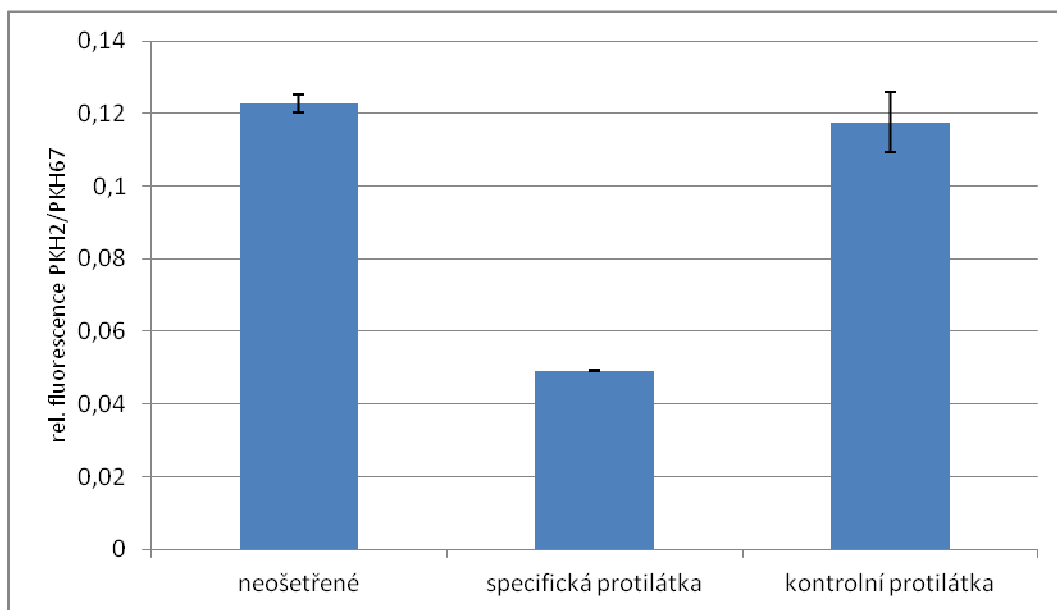
Obr. 22 - Relativní adherence bakterií PAK na buňky CuFi-1

Byl použit kontrolní kmen bakterií (PAK). Do grafu byly vyneseny poměry relativní fluorescence bakterií (PKH26: Ex/Em – 522/569 nm) a buněk CuFi-1 (PKH67: Ex/Em – 470/505 nm) určené pro jednotlivé směsi. Graf reprezentuje situaci po odmytí neadherovaných bakterií. Hodnoty relativní fluorescence použité pro určení poměru jsou po odečtu pozadí (buňky: 19924, bakterie: 3917). Jsou vyneseny průměrné hodnoty vždy ze 3 jamek včetně směrodatné odchylky.



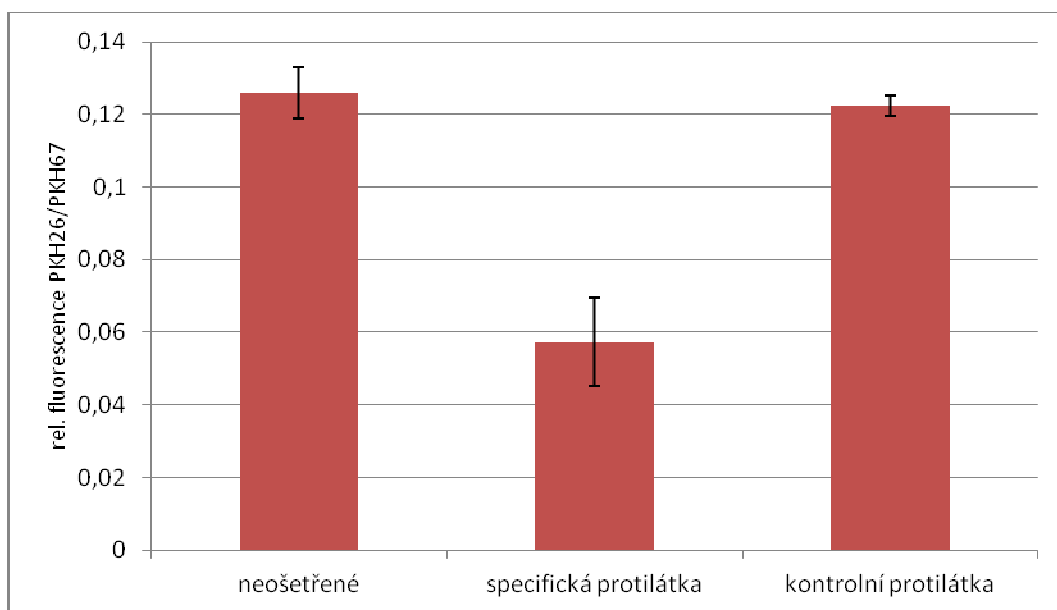
Obr. 23 - Relativní adherence bakterií PAK na buňky NuLi-1

Byl použit kontrolní kmen bakterií (PAK). Do grafu byly vyneseny poměry relativní fluorescence bakterií (PKH26: Ex/Em – 522/569 nm) a buněk NuLi-1 (PKH67: Ex/Em – 470/505 nm) určené pro jednotlivé směsi. Graf reprezentuje situaci po odmytí neadherovaných bakterií. Hodnoty relativní fluorescence použité pro určení poměru jsou po odečtu pozadí (buňky: 21784, bakterie: 3826). Jsou vyneseny průměrné hodnoty vždy ze 3 jamek včetně směrodatné odchylky.



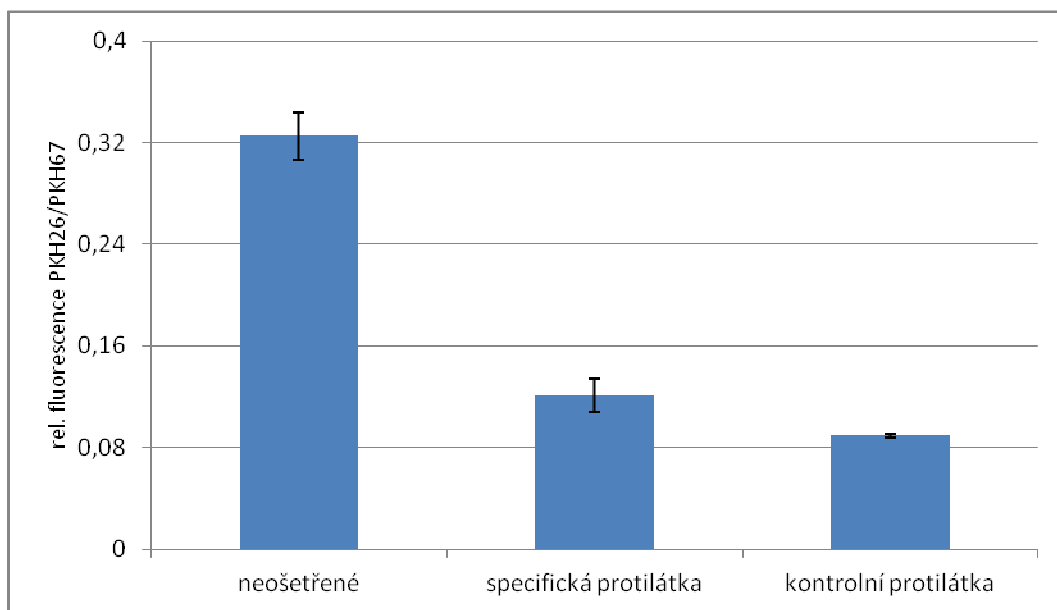
Obr. 24 - Relativní adherence bakterií PA01 na buňky CuFi-1

Byl použit sbírkový kmen bakterií (PA01). Do grafu byly vyneseny poměry relativní fluorescence bakterií (PKH26: Ex/Em – 522/569 nm) a buněk CuFi-1 (PKH67: Ex/Em – 470/505 nm) určené pro jednotlivé směsi. Graf reprezentuje situaci po odmytí neadherovaných bakterií. Hodnoty relativní fluorescence použité pro určení poměru jsou po odečtu pozadí (buňky: 5311, bakterie: 3845). Jsou vyneseny průměrné hodnoty vždy ze 3 jamek včetně směrodatné odchylky.



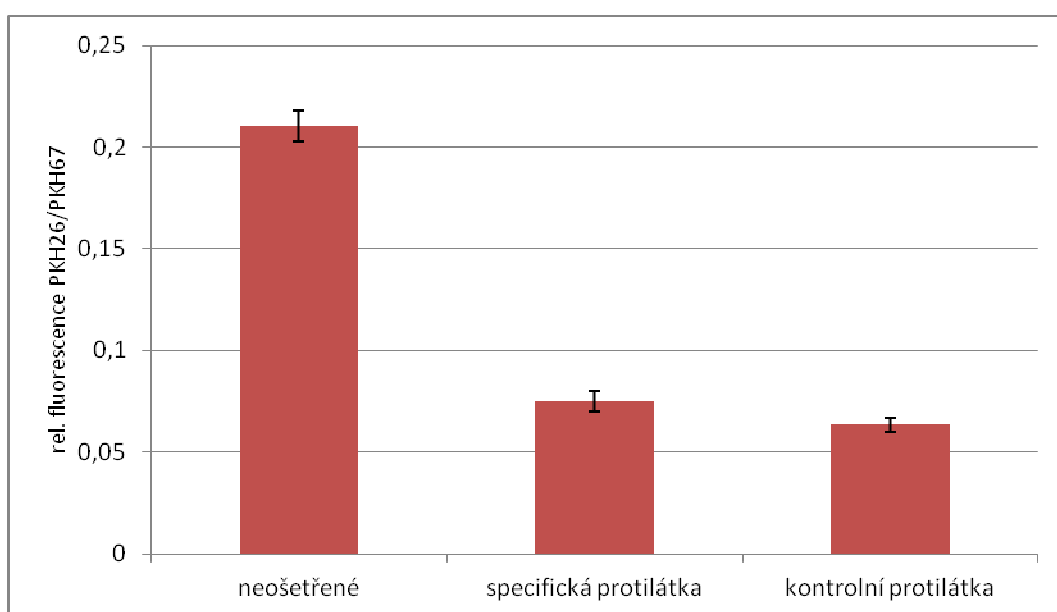
Obr. 25 - Relativní adherence bakterií PA01 na buňky NuLi-1

Byl použit sbírkový kmen bakterií (PA01). Do grafu byly vyneseny poměry relativní fluorescence bakterií (PKH26: Ex/Em – 522/569 nm) a buněk NuLi-1 (PKH67: Ex/Em – 470/505 nm) určené pro jednotlivé směsi. Graf reprezentuje situaci po odmytí neadherovaných bakterií. Hodnoty relativní fluorescence použité pro určení poměru jsou po odečtu pozadí (buňky: 8963, bakterie: 3612). Jsou vyneseny průměrné hodnoty vždy ze 3 jamek včetně směrodatné odchylky.



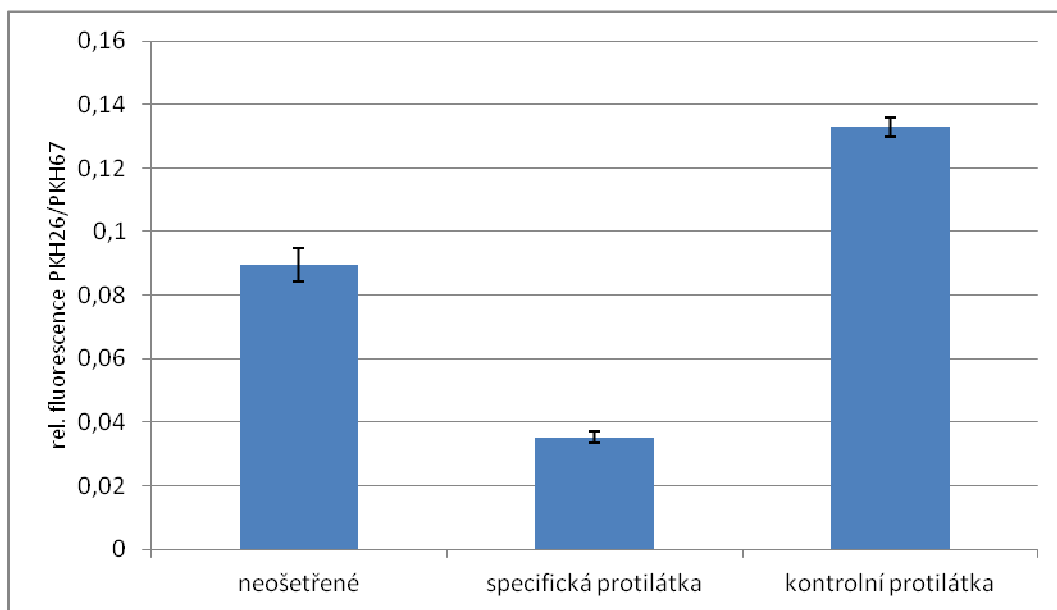
Obr. 26 - Relativní adherence bakterií PA 966 na buňky CuFi-1

Byl použit sbírkový kmen bakterií (PA 966). Do grafu byly vyneseny poměry relativní fluorescence bakterií (PKH26: Ex/Em – 522/569 nm) a buněk CuFi-1 (PKH67: Ex/Em – 470/505 nm) určené pro jednotlivé směsi. Graf reprezentuje situaci po odmytí neadherovaných bakterií. Hodnoty relativní fluorescence použité pro určení poměru jsou po odečtu pozadí (buňky: 16042, bakterie: 3817). Jsou vyneseny průměrné hodnoty vždy ze 3 jamek včetně směrodatné odchylky.



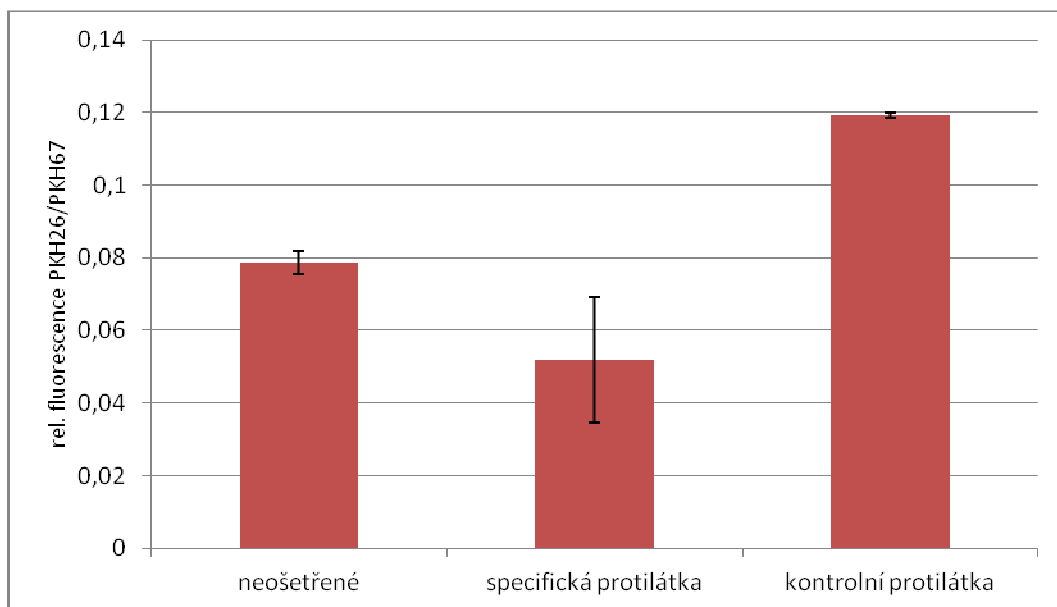
Obr. 27 - Relativní adherence bakterií PA 966 na buňky NuLi-1

Byl použit sbírkový kmen bakterií (PA 966). Do grafu byly vyneseny poměry relativní fluorescence bakterií (PKH26: Ex/Em – 522/569 nm) a buněk NuLi-1 (PKH67: Ex/Em – 470/505 nm) určené pro jednotlivé směsi. Graf reprezentuje situaci po odmytí neadherovaných bakterií. Hodnoty relativní fluorescence použité pro určení poměru jsou po odečtu pozadí (buňky: 14236, bakterie: 3807). Jsou vyneseny průměrné hodnoty vždy ze 3 jamek včetně směrodatné odchylky.



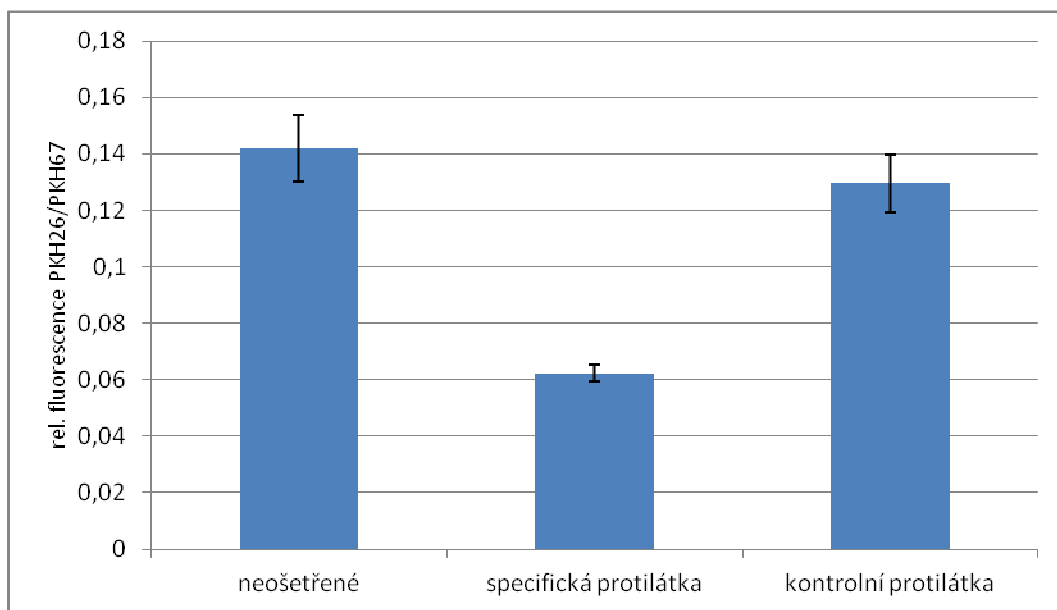
Obr. 28 - Relativní adherence bakterií PA 1003 na buňky CuFi-1

Byl použit sbírkový kmen bakterií (PA 1003). Do grafu byly vyneseny poměry relativní fluorescence bakterií (PKH26: Ex/Em – 522/569 nm) a buněk CuFi-1 (PKH67: Ex/Em – 470/505 nm) určené pro jednotlivé směsi. Graf reprezentuje situaci po odmytí neadherovaných bakterií. Hodnoty relativní fluorescence použité pro určení poměru jsou po odečtu pozadí (buňky: 5004, bakterie: 3817). Jsou vyneseny průměrné hodnoty vždy ze 3 jamek včetně směrodatné odchylky.



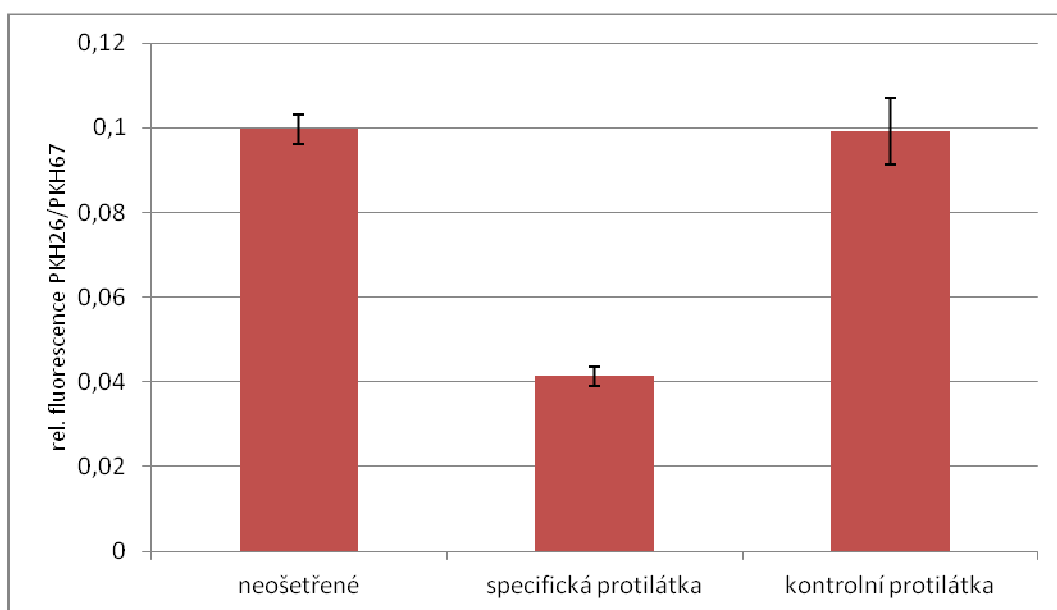
Obr. 29 - Relativní adherence bakterií PA 1003 na buňky NuLi-1

Byl použit sbírkový kmen bakterií (PA 1003). Do grafu byly vyneseny poměry relativní fluorescence bakterií (PKH26: Ex/Em – 522/569 nm) a buněk NuLi-1 (PKH67: Ex/Em – 470/505 nm) určené pro jednotlivé směsi. Graf reprezentuje situaci po odmytí neadherovaných bakterií. Hodnoty relativní fluorescence použité pro určení poměru jsou po odečtu pozadí (buňky: 4359, bakterie: 3663). Jsou vyneseny průměrné hodnoty vždy ze 3 jamek včetně směrodatné odchylky.



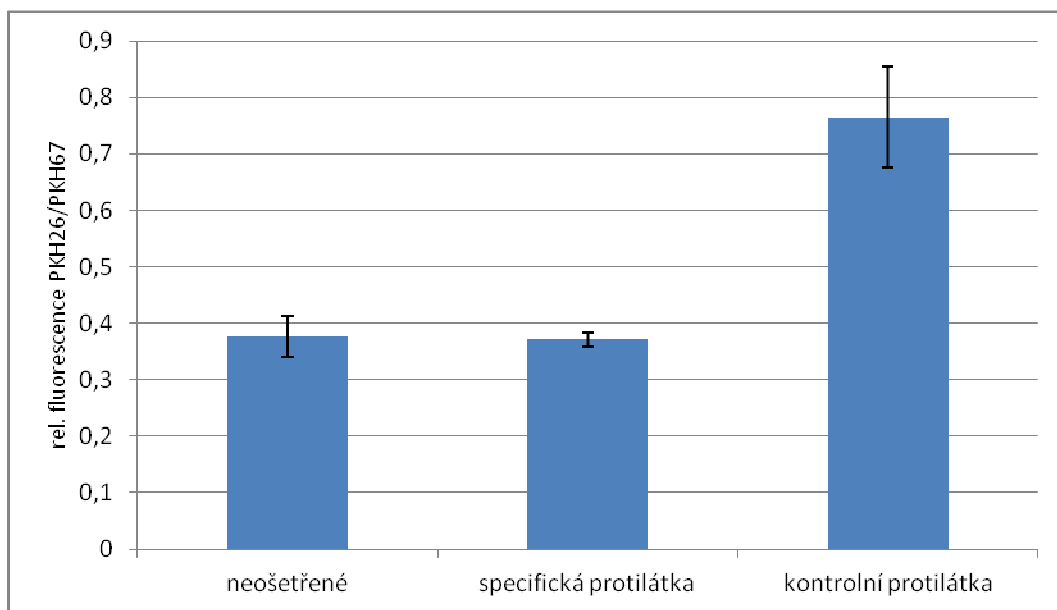
Obr. 30 - Relativní adherence bakterií PA 1022 na buňky CuFi-1

Byl použit sbírkový kmen bakterií (PA 1022). Do grafu byly vyneseny poměry relativní fluorescence bakterií (PKH26: Ex/Em – 522/569 nm) a buněk CuFi-1 (PKH67: Ex/Em – 470/505 nm) určené pro jednotlivé směsi. Graf reprezentuje situaci po odmytí neadherovaných bakterií. Hodnoty relativní fluorescence použité pro určení poměru jsou po odečtu pozadí (buňky: 8384, bakterie: 3659). Jsou vyneseny průměrné hodnoty vždy ze 3 jamek včetně směrodatné odchylky.



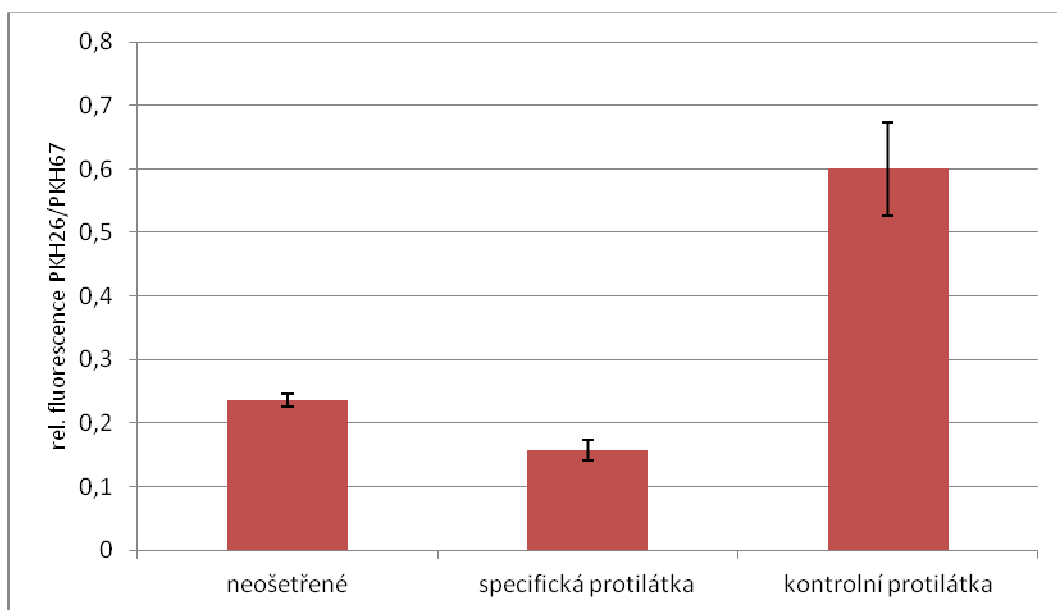
Obr. 31 - Relativní adherence bakterií PA 1022 na buňky NuLi-1

Byl použit sbírkový kmen bakterií (PA 1022). Do grafu byly vyneseny poměry relativní fluorescence bakterií (PKH26: Ex/Em – 522/569 nm) a buněk NuLi-1 (PKH67: Ex/Em – 470/505 nm) určené pro jednotlivé směsi. Graf reprezentuje situaci po odmytí neadherovaných bakterií. Hodnoty relativní fluorescence použité pro určení poměru jsou po odečtu pozadí (buňky: 10625, bakterie: 3600). Jsou vyneseny průměrné hodnoty vždy ze 3 jamek včetně směrodatné odchylky.



Obr. 32 - Relativní adherence bakterií PA CF na buňky CuFi-1

Byl použit sbírkový kmen bakterií (PA CF). Do grafu byly vyneseny poměry relativní fluorescence bakterií (PKH26: Ex/Em – 522/569 nm) a buněk CuFi-1 (PKH67: Ex/Em – 470/505 nm) určené pro jednotlivé směsi. Graf reprezentuje situaci po odmytí neadherovaných bakterií. Hodnoty relativní fluorescence použité pro určení poměru jsou po odečtu pozadí (buňky: 4617, bakterie: 1361). Jsou vyneseny průměrné hodnoty vždy ze 3 jamek včetně směrodatné odchylky.



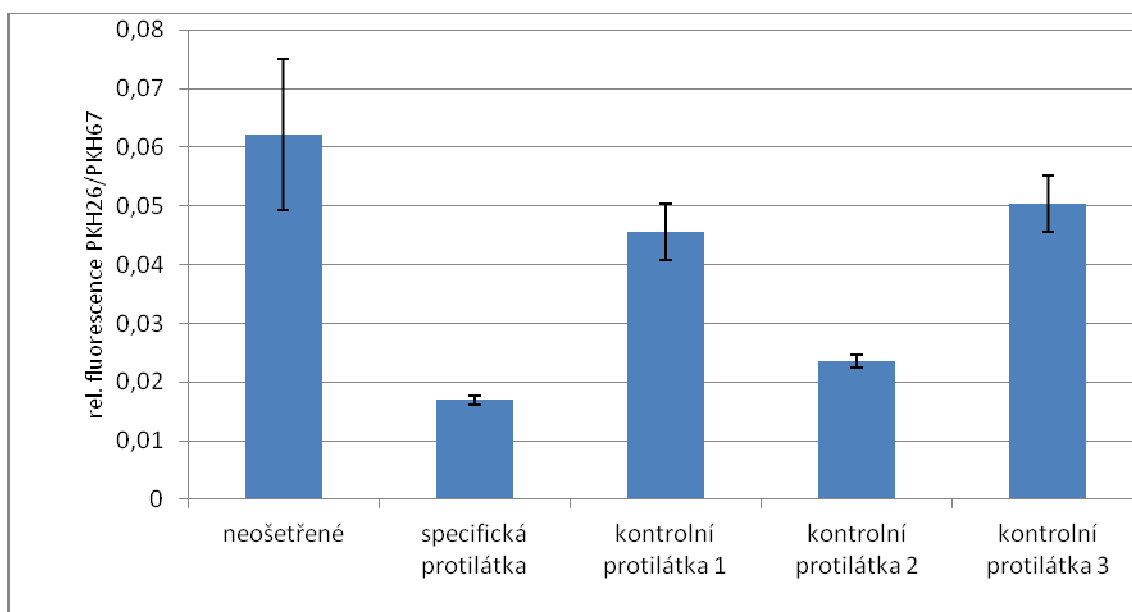
Obr. 33 - Relativní adherence bakterií PA CF na buňky NuLi-1

Byl použit sbírkový kmen bakterií (PA CF). Do grafu byly vyneseny poměry relativní fluorescence bakterií (PKH26: Ex/Em – 522/569 nm) a buněk NuLi-1 (PKH67: Ex/Em – 470/505 nm) určené pro jednotlivé směsi. Graf reprezentuje situaci po odmytí neadherovaných bakterií. Hodnoty relativní fluorescence použité pro určení poměru jsou po odečtu pozadí (buňky: 4617, bakterie: 1361). Jsou vyneseny průměrné hodnoty vždy ze 3 jamek včetně směrodatné odchylky.

4.3.5 Porovnání účinku kontrolních protilátek

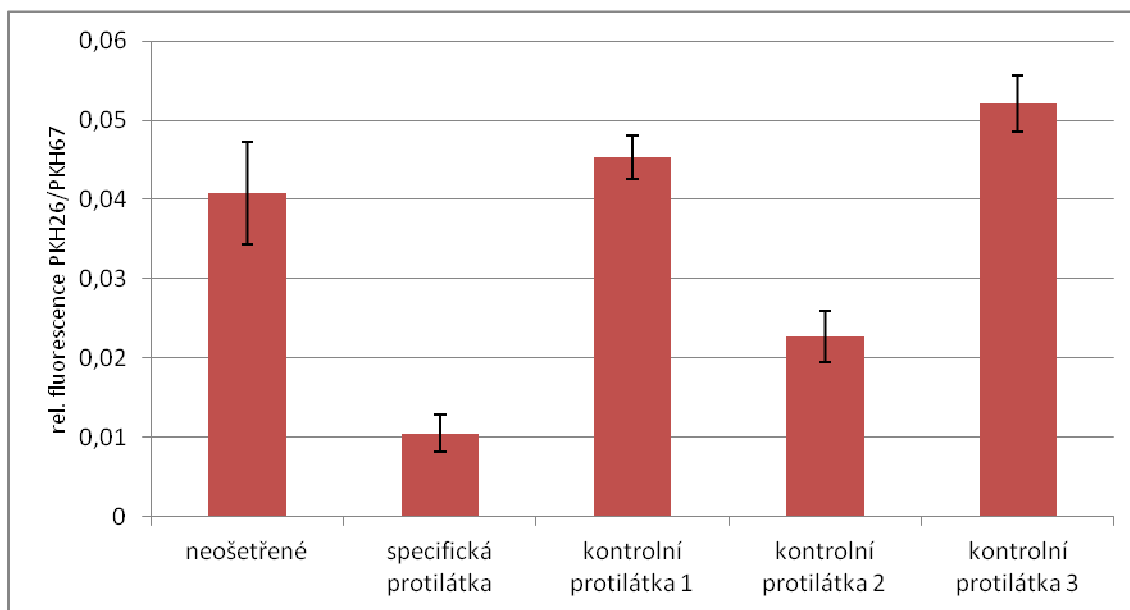
Na bakteriálním kmenu PAK byl porovnáván účinek několika slepičích kontrolních protilátek, které byly získány z vajíček před imunizací zvířete.

Byl proveden adhezní test (viz 3.5). Použity byly 3 různé kontrolní protilátky. Ty byly porovnávány s účinkem specifické protilátky a s bakteriemi neošetřenými protilátkou. Dané protilátky byly použity v koncentraci 1 mg/ml. Výsledné grafy jsou na obrázku 34 pro CuFi-1 a na obrázku 35 na straně 59 pro NuLi-1.



Obr. 34 - Relativní adherence bakterií PAK na buňky CuFi-1

Byl použit kontrolní kmen bakterií (PAK). Do grafu byly vyneseny poměry relativní fluorescence bakterií (PKH26: Ex/Em – 522/569 nm) a buněk CuFi-1 (PKH67: Ex/Em – 470/505 nm) určené pro jednotlivé směsi. Graf reprezentuje situaci po odmytí neadherovaných bakterií. Hodnoty relativní fluorescence použité pro určení poměru jsou po odečtu pozadí (buňky: 6611, bakterie: 3733). Jsou vyneseny průměrné hodnoty vždy ze 3 jamek včetně směrodatné odchylky.

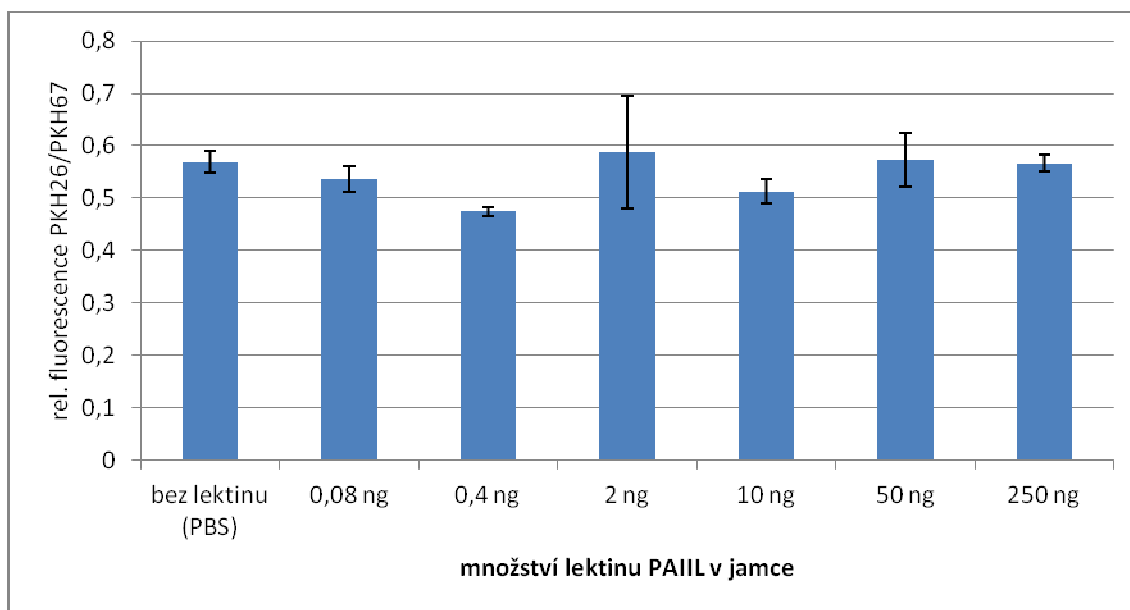


Obr. 35 - Relativní adherence bakterií PAK na buňky NuLi-1

Byl použit kontrolní kmen bakterií (PAK). Do grafu byly vyneseny poměry relativní fluorescence bakterií (PKH26: Ex/Em – 522/569 nm) a buněk NuLi-1 (PKH67: Ex/Em – 470/505 nm) určené pro jednotlivé směsi. Graf reprezentuje situaci po odmytí neadherovaných bakterií. Hodnoty relativní fluorescence použité pro určení poměru jsou po odečtu pozadí (buňky: 6163, bakterie: 3948). Jsou vyneseny průměrné hodnoty vždy ze 3 jamek včetně směrodatné odchylky.

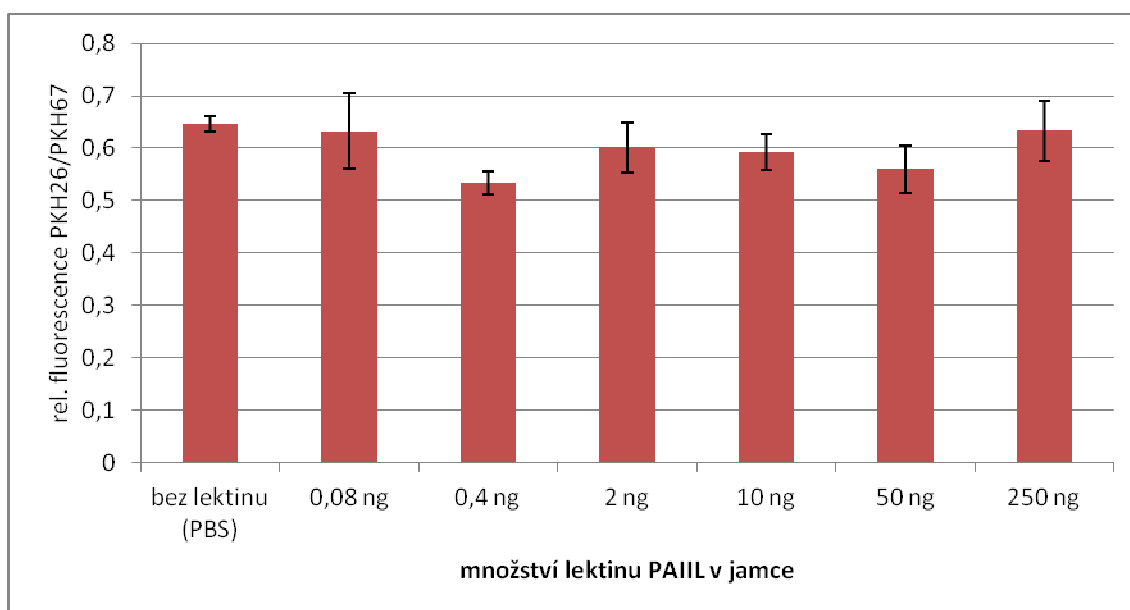
4.3.6 Vliv volného lektinu PA-IIL na adhezenci bakteriálních buněk

Připravený roztok lektinu byl v daném množství nanesen na plicní buňky a po inkubaci odebrán, dále bylo postupováno dle obvyklého postupu (viz 3.5). Jako kontrola byl použit roztok PBS. Výsledné hodnoty pro CuFi-1 jsou na obrázku 36 a pro NuLi-1 na obrázku 37 na straně 60.



Obr. 36 - Relativní adherence bakterií PAK na buňky CuFi-1 v závislosti na koncentraci lektinu PA-IIL

Byl použit kontrolní kmen bakterií (PAK). Do grafu byly vyneseny poměry relativní fluorescence bakterií (PKH26: Ex/Em – 522/569 nm) a buněk CuFi-1 (PKH67: Ex/Em – 470/505 nm) určené pro jednotlivé koncentrace lektinu (PA-IIL). Graf reprezentuje situaci po odmytí neadherovaných bakterií. Hodnoty relativní fluorescence použité pro určení poměru jsou po odečtu pozadí (buňky: 7054, bakterie: 5941). Jsou vyneseny průměrné hodnoty vždy ze 3 jamek včetně směrodatné odchylky.



Obr. 37 - Relativní adherence bakterií PAK na buňky NuLi-1 v závislosti na koncentraci lektinu PA-IIL

Byl použit kontrolní kmen bakterií (PAK). Do grafu byly vyneseny poměry relativní fluorescence bakterií (PKH26: Ex/Em – 522/569 nm) a buněk NuLi-1 (PKH67: Ex/Em – 470/505 nm) určené pro jednotlivé koncentrace lektinu (PA-IIL). Graf reprezentuje situaci po odmytí neadherovaných bakterií. Hodnoty relativní fluorescence použité pro určení poměru jsou po odečtu pozadí (buňky: 6028, bakterie: 5882). Jsou vyneseny průměrné hodnoty vždy ze 3 jamek včetně směrodatné odchylky.

5 Diskuze

Cystická fibrosa je autozomálně recesivní onemocnění způsobené mutací v genu *CFTR*, který kóduje chloridový kanál. Jeho poškození vede k poruše rovnováhy elektrolytů, zahuštění hlenu v plicích a změnám glykosylace povrchů dýchacích cest, které se následně stávají cílem bakteriální infekce. Jedním z nejčastějších patogenů u CF je bakterie *Pseudomonas aeruginosa*. Běžným postupem při kolonizaci tímto patogenem je antibiotická léčba, která je ale komplikována vznikem rezistencí.

Jako vhodná alternativa se jeví profylaxe pacientů slepičími protilátkami. Bezpečnost těchto protilátek byla prokázána v pokusech na potkanech, kteří inhalovali aerosol IgY. U těchto zvířat nebylo zjištěno žádné poškození plic ani zvýšená produkce zánětlivých faktorů [51].

Na myších modelech bylo prokázáno, že orální podávání specifického IgY může sloužit jako pasivní imunizace ke snížení kolonizace dýchacích cest bakteriemi PA. Podávání této protilátky zlepšuje clearance bakterií z dýchacích cest a zmírňuje zánět. Bylo prokázáno, že slepičí IgY mění fyzikálně-chemické vlastnosti bakterií, které jsou následně snáze fagocytovány [52].

Imunoglobuliny vaječného žloutku jsou využívány jako terapeutické agens proti mnoha patogenům. Jejich snadná a levná výroba je činí slibným terapeutickým prostředkem pro léčbu řady infekčních chorob. V současnosti jsou slepičí protilátky používány jako prevence proti střevním patogenům u hospodářských zvířat, zejména proti rotavirům, *E. coli*, koronavirům a *Salmonella* spp. [53]. Jsou také používány jako antiséra k neutralizaci hadích jedů při uštknutí [54].

Slepičí protilátky byly také testovány jako možná profylaxe a terapie infekcí virem chřipky. Tyto protilátky efektivně vážou virovou neuraminidasu a hemagglutinin a na buněčných kulturách i myších modelech bylo pozorováno snížení infekce tímto virem [55]. Slepičí imunoglobuliny již byly testovány ve formě kloktadla jako prevence bakteriálních infekcí *Pseudomonas aeruginosa* u pacientů s CF. V těchto studiích bylo zjištěno, že po podávání těchto protilátek se zlepšily plicní funkce těchto pacientů a snížil se výskyt chronických infekcí. Tyto protilátky jsou tedy slibným prostředkem k profylaxi bakteriálních infekcí [56].

V této práci proto byly studovány slepičí protilátky, které byly připraveny proti bakteriálnímu lektinu PA-IIL, jenž je považován za významný virulenční faktor umožňující adherenci bakterií *Pseudomonas aeruginosa* na buňky plicního epitelu. Přestože používané protilátky byly dlouhodobě uloženy v chladu v roztoku s azidem sodným, metodou ELISA bylo potvrzeno, že si protilátka vyrobená proti rekombinantnímu lektinu PA-IIL zachovala schopnost specificky tento lektin rozpoznávat a vázat. Byla potvrzena koncentrační závislost tohoto trendu pro lektin PA-IIL i pro lektin PA-IILΔG, který je zkrácený o glycin na C-konci.

Pomocí „Western blotu“ bylo prokázáno, že používaná protilátka specificky rozpoznává lektin PA-IIL přirozeně exprimovaný bakteriemi *Pseudomonas aeruginosa*, a to jak jeho monomerní (11,7 kDa), tak i dimerní (23,4 kDa) formu. Dle našeho výsledku je zřejmé, že k produkci lektinu došlo při pěstování v obou druzích média a pro další experimenty bylo používáno zejména plné médium. V literatuře je zaznamenáno, že minimální médium by mělo zvyšovat expresi lektinu PA [50]. Z našeho výsledku však žádný výrazný rozdíl mezi médii není zřetelný.

V případě PA lux pravděpodobně část lektinu zůstala v dimerní formě, jak je vidět z přítomnosti proteinových zón v oblasti 20-25 kDa. Velmi pravděpodobně jsou přítomné i tetramery lektinu. K přesnějšímu vyvolání pouze lektinu PA-IIL by bylo nutné protilátku afinitně purifikovat.

Jako modelový systém napodobující podmínky v plicích pacientů s CF byly použity buněčné linie epitelálních buněk od zdravého jedince (NuLi-1) a od pacienta s CF (CuFi-1), které byly vystaveny působení bakteriálních kmenů *Pseudomonas aeruginosa* v přítomnosti protilátek proti lektinu PA-IIL. Aby bylo možno buňky kvantifikovat, byly barveny fluorescenčními barvivy PKH26 (bakteriální buňky) a PKH67 (buňky plicního epitelu). Výhodou těchto barviv je minimální ovlivnění pohyblivosti, životaschopnosti a zejména povrchových struktur buněk, takže by nemělo docházet k ovlivnění adheze. Bylo prokázáno, že pro námi používané rozmezí je fluorescence přímo úměrná počtu buněk [57].

Fluorescence buněk byla spektrofotometricky měřena a sestaveny poměry rel. fluorescence, následně byla kvalita barvení a stav obou typů buněk v přítomnosti, resp. nepřítomnosti protilátek, hodnocena mikroskopicky na fluorescenčním mikroskopu Nikon Eclipse.

V experimentech byly použity dva typy protilátek – specifická a kontrolní. Kontrolní protilátka byla izolována z vajec před imunizací slepice a specifická protilátka pochází od slepice po imunizaci rekombinantním lektinem PA-IIL.

Vzhledem k tomu, že použité linie plicních buněk jsou adherentní, byly experimenty prováděny ve 24-jamkových destičkách Corning CellBind. Tyto destičky mají upravený povrch jamek vhodný k adhezi buněk, která musí být pevná, aby během experimentu nedocházelo k odmyívání plicních buněk a vzniku falešně vysokých hodnot poměrů fluorescence.

Pro určení optimální koncentrace protilátek pro experimenty byla zkoumána koncentrační závislost vlivu specifické a kontrolní protilátky na adhezi bakteriálních buněk na buňky plicního epitelu. Z grafu na obrázku 10 a 11 je zřejmé, že množství adherovaných bakteriálních buněk s rostoucí koncentrací specifické protilátky klesá. Tento trend je stejný u obou linií plicních buněk. Jako optimální koncentrace pro další experimenty byla zvolena koncentrace 1 mg/ml, kde již dochází k výraznému poklesu adherence. Z grafů je patrné, že se závislost skládá ze dvou částí – k hodnotě koncentrace 1 mg/ml dochází k prudkému poklesu adherence se zvyšující se koncentrací protilátky, zatímco u vyšších koncentrací (2 a 4 mg/ml) je tento pokles mnohem mírnější. Příčinu tohoto jevu neznáme. Bylo by vhodné tento experiment zopakovat s afinitně purifikovanou protilátkou pro větší rozsah koncentrací.

V případě kontrolní protilátky (obrázky 12 a 13) se naopak množství neodmytých bakterií se zvyšující se koncentrací kontrolní protilátky zvyšuje a od koncentrace 1 mg/ml se již příliš nemění. Tento jev je pravděpodobně způsoben interakcí kontrolní protilátky s bakteriálními buňkami přes sacharidové struktury přítomné na IgY. Protilátky s bakteriálními buňkami mohou vytvářet síť, čímž je způsobeno zachycení bakterií a jejich obtížnější odmytí. Tomuto předpokladu odpovídá i trend závislosti, kdy nejprve dochází k prudkému nárůstu s rostoucí koncentrací protilátky, ale od určité koncentrace (1 mg/ml) již k dalšímu nárůstu nedochází, tedy všechny bakteriální buňky jsou již pravděpodobně vyvázány molekulami kontrolní protilátky a nemohou se vázat na další. Tato situace by byla kritická při použití těchto protilátek u pacientů s CF. Pokud by podávaná směs protilátek k profylaxi neobsahovala dostatečné množství specifických protilátek, interakce mezi bakteriální buňkou a nespecifickou protilátkou by ještě mohla zesilovat retenci bakterií na epitelu.

Reprodukovatelně bylo u všech adhezních testů prokázáno, že protilátky výrazně blokují adhezi bakterií na plicní buňky (až o 67%). V souladu s daty *in vivo* u pacientů s cystickou fibrózou dochází u většiny bakteriálních kmenů k vyšší adhezenci bakterií na buňky CuFi-1 než na buňky NuLi-1. Z toho lze usuzovat, že zvolený model dobře odpovídá reálné situaci, která je v plicích pacientů s CF, kde patologické změny navozují zvýšenou citlivost k adhezenci bakterií.

Růstové médium má vliv na expresi povrchových struktur bakterií [50]. Minimální médium by mělo produkci adhezivních struktur zvyšovat a bakteriální buňky by měly lépe adherovat. Proto byl porovnáván vliv růstového média pro bakteriální buňky na schopnost adheze na buňky plicního epitelu. K tomuto účelu bylo použito plné a minimální růstové médium. Z výsledků na obrázcích 14 a 15 je zřejmé, že trend je u obou druhů médií stejný – specifická protilátka vazbu bakterií na plicní buňky snižuje a kontrolní protilátka ji zvyšuje. U bakterií pěstovaných v minimálním médiu není zvýšení v případě kontrolní protilátky tak výrazné, což je pravděpodobně způsobeno absencí některých povrchových struktur, které mohou zprostředkovávat vazbu s protilátkou. Pro další experimenty byly bakteriální buňky pěstovány v plném médiu, protože, jak je zřejmé z příslušných grafů, je zde výraznější pokles adherovaných bakteriálních buněk při použití specifické protilátky oproti neošetřeným buňkám.

Aby byl vyloučen vliv ovlivnění bakteriálních buněk procesem barvení, byl využit luminiscenční kmen PA. Luminiscence bakterií je závislá na bakteriální viabilitě, pokud jsou buňky poškozené nebo usmrčené, luminiscenci neposkytují. Naopak fluorescenčně značené buňky poskytují fluorescenci stále, i pokud dojde k usmrcení. Proto část bakterií byla obarvena fluorescenčním barvivem PKH26 a část ponechána nebarvená. U bakterií barvených PKH26 byla měřena fluorescence i luminiscence, u nebarvených pouze luminiscence. Hodnoty získané pro barvené i nebarvené bakterie byly porovnány. Data získaná z měření fluorescence i luminiscence bakteriálních buněk vykazují obdobný trend (obrázky 16-20). Množství bakterií je na buňkách CuFi-1 vyšší než na buňkách NuLi-1. Ve všech případech také dochází ke srovnatelnému poklesu množství navázaných bakteriálních buněk v případě použití specifické protilátky proti lektinu PA-IIL. Barvení tedy na viabilitu bakterií a schopnost jejich adherence na plicní buňky nemá vliv. Virulenční struktury jako jsou bičíky a fimbrie, které mohou být procesem barvení poškozeny, tedy asi nemají

zásadní vliv na adhezi bakterií. Zásadní pro schopnost adheze jsou pravděpodobně pevně vázané virulentní faktory, mezi něž patří i lektiny.

Účinek specifické protilátky proti lektinu PA-IIL byl porovnáván ještě na dalších 6 kmenech PA. Byly použity 4 kmeny PA izolované od pacientů s CF (ST 966, 1003, 1022, PA-CF), kmen PA01 a PAK (ST1763). Z výsledků (obrázky 22-33) je zřejmé, že většina kmenů je citlivá na působení slepičích protilátek proti PA-IIL. Adherence bakteriálních buněk na buňky plicního epitelu u všech kmenů PA byla výrazně snížena při použití specifické protilátky oproti bakteriím bez přidaných ovlivňujících agens. Některé bakteriální kmeny se více vážou na buňky CuFi-1, u jiných není rozdíl mezi zdravými a CF buňkami zřetelný.

PA 966 vykazuje rozdílné chování oproti ostatním bakteriálním kmenům. Neošetřené bakterie vykazují největší rozdíl ve vazbě na CuFi-1 a NuLi-1 buňky ze všech použitých kmenů, ale protilátka proti lektinu PA-IIL je zde méně účinná v zabránění adheze než protilátka kontrolní. Zdá se, že tento kmen pro vazbu na epiteliální buňky využívá jiné virulenční faktory než jen lektin PA-IIL. Snížení adheze v přítomnosti kontrolní protilátky svědčí o tom, že daná slepice se pravděpodobně s tímto kmenem PA jako patogenem již setkala a ve směsi kontrolní protilátky jsou protilátky proti jejím virulenčním faktorům.

Na bakteriálním kmenu PAK byl porovnáván účinek různých kontrolních protilátek. Tyto protilátky byly získány od daného zvířete před imunizací antigenem. Z výsledků (obrázky 34 a 35) je zřejmé, že kontrolní protilátka 1 a 3 zvyšuje vazbu bakterií na plicní buňky, ale protilátka 2 ji naopak snižuje, i když pokles není tak značný jako u protilátky specifické. Chování kontrolní protilátky 2 může být způsobeno tím, že se dané experimentální zvíře, od kterého tato protilátka byla získána, s touto bakterií již setkala a vytvořilo si na ni příslušné protilátky.

Kromě použití protilátek proti lektinu PA-IIL byla zkoumána možnost negativně ovlivnit vazbu bakterií na plicní buňky přidáním volného rekombinantního lektinu PA-IIL k CuFi-1, resp. NuLi-1 buňkám a tím zablokovat sacharidy, na které se bakterie váže. Byly použity různé koncentrace daného lektinu. Dle výsledků (obrázky 36 a 37) přítomností lektinu do koncentrace 250 ng lektinu na jamku nedochází k ovlivnění vazby bakteriálních buněk na žádnou z použitých plicních buněčných linií. Nelze vyloučit, že lektin přirozeně produkováný bakteriemi má větší afinitu ke glykanovým

epitopům na povrchu plicních buněk než lektin uměle vyrobený. Je však možné, že použitá koncentrace lektinu byla příliš nízká.

Je zřejmé, že ovlivnění adheze volným lektinem nemůže být tak účinné díky tomu, že afinita protilátky vůči svému antigenu je o několik řádů vyšší než vazba lektinu na rozpoznávanou sacharidovou strukturu. Afinitní konstanta pro slepičí protilátky je zhruba $5 \cdot 10^{11}$ l/mol [58], zatímco afinitní konstanta pro lektin PA-IIL je $1,6 \cdot 10^6$ l/mol [39].

6 Souhrn

- Byla ověřena schopnost slepičích protilátek připravených proti bakteriálnímu lektinu PA-IIL specificky rozpoznávat tento lektin a to jak rekombinantní, tak přirozeně exprimovaný bakteriálními buňkami *Pseudomonas aeruginosa*.
- Použitím luminiscenčního kmenu bylo prokázáno, že barvení fluorescenčními barvivy nemá vliv na schopnost adheze bakteriálních buněk a jejich viabilitu.
- Specifická slepičí protilátka proti lektinu PA-IIL efektivně snižuje schopnost adheze bakteriálních buněk na buňky plicního epitelu až o 67 % u obou linií plicních buněk oproti buňkám bez přidané protilátky; byla prokázána koncentrační závislost tohoto trendu.
- Kontrolní protilátka vazbu bakterií zvyšuje a tento trend se projevuje až do koncentrace 1 mg/ml.
- Přidání rekombinantního lektinu PA-IIL (do koncentrace 250 ng) k plicním buňkám neovlivnilo adhezi bakterií na tyto buňky.

7 Seznam použité literatury

- [1] Balašáková M., Piskáčková T., Holubová A., Raušová E., Kazárová V., Krebsová A., Koudová M., Štambergová A., Čamajová J., Norambuena P., Křenková P., Votava F., Skalická V., Vávrová V., Macek M., Macek M.; Čes.-slov. Pediat. 2008; 63; 62–75
- [2] <http://kintalk.org/genetics-101/>, duben 2016
- [3] http://journals.cambridge.org/fulltext_content/ERM/ERM3_07/S1462399401002551sup001.pdf, březen 2016
- [4] Bush A.; Cystic fibrosis in the 21st century; Karger 2006
- [5] O'Sullivan B. P., Freedman S. D.; J.- Lancet 2009; 373; 1891-1904
- [6] Vávrová V. a kol.; Cystická fibróza; Grada Publishing 2006
- [7] De Boeck K., Zolin A., Cuppens H., Olesen H. V., Viviani L.; J. Cyst. Fibros.; 2014
- [8] Radlović N; Srp. Arh. Celok. Lek. 2012; 140; 244–249
- [9] <https://www.nhlbi.nih.gov/health/health-topics/topics/cf/signs>, březen 2016
- [10] Votava F., Kožich V., Chrastina P., Pešková K., Adam T., Friedecký D., Hlídková E., Vinohradská H., Dejmek P., Krulišová V., Holubová A., Balašáková M., Piskáčková T., Macek M., Gaillyová R., Valášková I., Skalická V.; Čes.-slov. Pediat 2014; 69; 77-86
- [11] Jakubec P.; Interní. Med. 2006; 5; 235–239
- [12] Vávrová V., Bartošová J., Fila L.; Klin. Farmakol. Farm. 2007; 21; 22-26
- [13] Elborn J. S., Hodson M., Bertram C.; J. Cyst. Fibros. 2009; 8; 211–217
- [14] Brodlie M., Haq I. J., Roberts K., Elborn J. S.; Genome Med. 2015; 7; 101-110
- [15] Prickett M., Jain M.; Transl. Res. 2013; 161; 255-264
- [16] Bangel-Ruland N., Tomczak K., Fernández E., Leier G., Leciejewski B., Rudolph C., Rosenecker J., Weber W. M.; J. Gene. Med. 2013; 15; 414-426
- [17] Douglas L.; J. Fam. Pract. 2016; 65; 188-194
- [18] Le Moigne V., Gaillard J.-L., Herrmann J.-L.; Med. Mal. Infect. 2016; 46; 4-9
- [19] Döring G., Gulbins E.; Cell. Microbiol. 2009; 11; 208–216
- [20] Bals R., Weiner D. J., Wilson J. M.; J. Clin. Invest. 1999; 3; 303-307
- [21] <http://www.britannica.com/science/antibody>, duben 2016
- [22] Hořejší V., Bartůňková J.; Základy imunologie; Triton 2009
- [23] Shade Kai-Ting C., Anthony R. M.; Antibodies 2013; 2; 392-414
- [24] http://www.fastbleep.com/assets/notes/image/6873_1.jpg, duben 2016
- [25] Nilsson E., Kollberg H., Johannesson M., Wejåker P. E., Carlander D., Larsson A.; J. Med. Food. 2007; 10; 375-378
- [26] Diraviyam T., Zhao B., Wang Y., Schade R., Michael A., Zhang X.; PLoS One. 2014; 5; 234-239
- [27] Carlander D., Stålberg J., Larsson A; Ups. J. Med. Sci. 1999; 104; 179-189

- [28] Spillner E., Braren I., Greunke K., Seismann H., Blank S., du Plessis D.; *Biologicals*. 2012; 40; 313-322
- [29] Dias da Silva W., Tambourgi D. V.; *Vet. Immunol. Immunopathol.* 2010; 15; 173-180
- [30] Tini M., Jewell U. R., Camenisch G., Chilov D., Gassmann M.; *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.* 2002; 131; 569-574
- [31] Venkatakrishnan V., Packer N. H., Morten T.-A.; *Host. Expert. Rev. Respir.* 2013; 7; 553-576
- [32] Yonker L. M., Cigana C., Hurley B. P., Bragonzi A.; *J. Cyst. Fibros.* 2015; 14; 431-439
- [33] Chemani C., Imberty A., de Bentzmann S., Pierre M., Wimmerová M., Guery B. P., Faure K.; *Infect. Immun.* 2009; 77; 2065-2075
- [34] Baron S.; *Medical Microbiology*; University of Texas Medical Branch at Galveston 1996
- [35] <http://ehp.niehs.nih.gov/wp-content/uploads/120/5/ehp.120-190.g001.png>, duben 2016
- [36] Schobert M., Jahn D.; *IJMM* 2010; 300; 549-556
- [37] Hauser A. R., Ozer E. A., *Nat. Rev. Microbiol.* 2011; 9; 123-128
- [38] <http://textbookofbacteriology.net/pseudomonas.html>, duben 2016
- [39] Imberty A., Wimmerova M., Mitchell E. P., Gilboa-Garber N.; *Microb. Infect.* 2004; 6; 221-228
- [40] <http://textbookofbacteriology.net/pseudomonas.html>, duben 2016
- [41] <http://fheathdamron.net/wp-content/uploads/2013/10/mucoid-nonmucoid.jpg>, duben 2016
- [42] Bartels K. M., Funken H., Knapp A., Bocker M., Bott M., Wilhelm S., Jaeger K. E., Rosenau F.; *J. Bacteriol.* 2011; 193; 1107-1113
- [43] Mitchell E. P., Sabin C., Snajdrová L., Pokorná M., Perret S., Gautier C., Hofr C., Gilboa-Garber N., Koca J., Wimmerová M., Imberty A.; *Proteins*. 2005; 58; 735-746
- [44] <http://www.ncbr.muni.cz/group/glykobio/lectins.html>, duben 2016
- [45] http://www.lgcstandards-atcc.org/products/all/CRL-4011.aspx?geo_country=cz#generalinformation, březen 2016
- [46] http://www.lgcstandards-atcc.org/products/all/CRL-4013.aspx?geo_country=cz#generalinformation, březen 2016
- [47] <https://www.lifetechnologies.com/order/catalog/product/12680013?ICID=searchproduct>, březen 2016
- [48] <http://www.lifetechnologies.com/cz/en/home/life-science/cellculture/transfection/selection/g418.html>, březen 2016
- [49] Nosková L., *Studium adheze *Pseudomonas aeruginosa* na buňky plicního epitelu*, Diplomová práce, PŘF UK, 2013

- [50] Scharfman A., Kroczyński H., Carnoy C., Van Brussel E., Lamblin G., Ramphal R., Roussel P., *Infect. Immun.* 1996; 64: 5417-5420
- [51] Hadrabová J., Majerová B., Černá V., Moserová M., Holuša R., Mandys V., Stiborová M., Stříž I., Hodek P.; *J. Appl. Biomed.* 2015; 13; 19-22
- [52] Thomsen K., Christophersen L., Bjarnsholt T., Jensen P. Ø., Moser C., Høiby N.; *J. Cyst. Fibros.* 2016; 15; 171-178
- [53] Diraviyam T., Zhao B., Wang Y., Schade R., Michael A., Zhang X.; *PLoS One.* 2014; 9; 112-121
- [54] Yoshinori M.; *Egg bioscience and biotechnology*; Wiley-Interscience 2008
- [55] Yang Y. E., Wen J., Zhao S., Zhang K., Zhou Y.; *J. Virol. Methods.* 2014; 206; 19-26
- [56] Nilsson E., Larsson A., Olesen H. V., Wejåker P. E., Kollberg H.; *Pediatr. Pulmonol.* 2008; 43; 892-899
- [57] Vašková L., *Studium adherence bakterií na plicní epitel nemocných Cystickou fibrózou*, Bakalářská práce, PřF UK, 2014
- [58] Carlander D., Stålberg J., Larsson A.; *Ups. J. Med. Sci.* 1999; 104; 179-189

Svoluji k zapůjčení této práce pro studijní účely a prosím, aby byla řádně vedena evidence vypůjčovatelů.

Jméno a příjmení	Adresa	Číslo OP	Datum vypůjčení	Poznámka